

ALMA MATER STUDIORUM-UNIVERSITA' DI BOLOGNA

SCUOLA DI FARMACIA, BIOTECNOLOGIE E SCIENZE MOTORIE

CORSO DI LAUREA IN BIOTECNOLOGIE

**Studio degli adattamenti istologici e genetici del muscolo
scheletrico di ratto indotto in torpore sintetico**

Presentata da:

Martina Castellucci

Relatore:

Dott.ssa Timna Hitrec

Matricola n°:

0001040711

Correlatore:

Dott.ssa Emiliana Piscitiello

**A.A. 2023/2024
Sessione unica**

ABSTRACT

Il torpore è uno stato fisiologico caratterizzato da ipometabolismo e ipotermia, adottato da alcuni animali come strategia di risparmio energetico in condizioni ambientali avverse. Durante il torpore si osservano significativi adattamenti a livello cellulare e sistemic, alcuni dei quali sono di particolare interesse per il loro potenziale traslazionale. In particolare, grazie a meccanismi ancora sconosciuti, non compare l'atrofia muscolare che ci si aspetterebbe dopo un periodo prolungato di inattività del muscolo scheletrico.

Poiché attualmente è possibile indurre uno stato di torpore artificiale (torpore sintetico, TS) nel ratto, specie non ibernante, attraverso l'inibizione farmacologica locale del nucleo termoregolatorio Raphe Pallidus (RPa), scopo della tesi è valutare gli adattamenti istologici e trascrittomici del muscolo scheletrico durante il TS. A tal fine, 8 ratti maschi Sprague-Dawley sono stati suddivisi in due gruppi sperimentali: i) IPO (n=4), indotti in TS per 8 ore tramite l'inibizione del RPa mediante iniezione locale del GABA_A agonista muscimolo; ii) NORM (n=4), controlli omeotermici (iniezione nel RPa del veicolo). Al termine delle procedure, gli animali sono stati sacrificati in anestesia generale ed è stato prelevato un campione di muscolo scheletrico, successivamente trattato per l'analisi morfologica (istologica e ultrastrutturale) e trascrittometrica.

In entrambi i gruppi, l'analisi morfologica ha mostrato l'assenza di alterazioni patologiche evidenti. L'analisi trascrittometrica ha rivelato una significativa variazione nell'espressione genica: nel gruppo IPO risultano sovraregolati numerosi geni associati al metabolismo lipidico e alla rigenerazione muscolare. Questi risultati svelano una complessa rete di adattamenti cellulari durante lo stato di ipotermia, che permettono di approfondire la conoscenza sul TS e pongono le basi per identificare nuove potenziali strategie terapeutiche nella gestione dell'atrofia muscolare.

INDICE

<u>1. INTRODUZIONE</u>	1
1.1. TERMOREGOLAZIONE	1
1.1.1. CONTROLLO CENTRALE DELLA TERMOREGOLAZIONE	1
1.2. TORPORE NATURALE	3
1.2.1. TORPORE GIORNALIERO	3
1.2.2. IBERNAZIONE	4
1.2.3. ADATTAMENTI DEL TORPORE NATURALE	5
1.2.4. BRUMAZIONE ED ESTIVAZIONE	7
1.3. CONTROLLO CENTRALE DEL TORPORE	7
1.4. TORPORE SINTETICO	8
1.4.1. APPLICAZIONI TRASLAZIONALI DEL TORPORE SINTETICO	9
<u>2. SCOPO</u>	10
<u>3. MATERIALI E METODI</u>	11
3.1. ANIMALI	11
3.2. PROCEDURE PREOPERATORIE	11
3.3. CHIRURGIA	11
3.4. PROTOCOLLO SPERIMENTALE	13
3.4.1. APPARATO DI REGISTRAZIONE	13
3.4.2. DISEGNO SPERIMENTALE	13
3.5. ANALISI ISTOLOGICA	14
3.5.1. MICROSCOPIA OTTICA	14
3.5.2. MICROSCOPIA ELETTRONICA	15
3.6. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA	15
3.6.1. SEQUENZIAMENTO DELL'RNA	15
3.6.2. ANALISI BIOINFORMATICA	16
<u>4. RISULTATI</u>	17
4.1. ANALISI ISTOLOGICA	17
4.1.1. MICROSCOPIA OTTICA	17
4.1.2. MICROSCOPIA ELETTRONICA	17
4.2. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA	18
<u>5. DISCUSSIONE</u>	20
<u>6. BIBLIOGRAFIA</u>	22

INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

5'-AMP 5'-adenosin monofosfato

A1R recettori centrali dell'adenosina A1

aCSF liquido cerebrospinale artificiale

AMPK AMP proteina chinasi

AP Antero-Posteriore

ARC nucleo arcuato

BAT tessuto adiposo bruno

DEGs geni differenzialmente espressi

DH corno dorsale

DMH ipotalamo dorso mediale

DV dorso ventrale

E&E ematossilina ed eosina

EEG elettroencefalogramma

FC Fold change

FDR False discovery rate

FPKM Fragments Per Kilobase Million

GABA_A recettore ionotropo per il GABA (acido γ -amminobutirrico)

H₂S acido solfidrico

HEP Humane End Point

IPO gruppo ipotermico

LD ciclo luce-buio

LL Latero-Laterale

LPB nucleo parabrachiale laterale

LPBd nucleo parabrachiale dorsomediale

LPBel nucleo parabrachiale dorsolaterale

MnPO nucleo preottico mediano

MPA area preottica mediale

MR tasso metabolico

NORM Controllo normotermico

NGS sequenziamento di nuova generazione

NTS nucleo del tratto solitario

Padj valore p aggiustato

PBS tampone fosfato salino

PCA analisi delle componenti principali

PFA paraformaldeide

POA area preottica

PVN nucleo paraventricolare

RGD Rat Genome Database

RNA-Seq sequenziamento dell'RNA

RPa Raphe Pallidus

SCN nucleo soprachiasmatico

SEM errore standard della media

Ta temperatura ambientale

Tb temperatura corporea

TEM microscopio elettronico a trasmissione

TMM Trimmed Mean of M -values

TRP canali del potenziale recettore transitorio

TS torpore sintetico

1. INTRODUZIONE

1.1. TERMOREGOLAZIONE

La termoregolazione è un complesso processo fisiologico che consente agli animali di regolare la loro temperatura corporea per mantenerla in un intervallo ottimale.

In base alla strategia adoperata per regolarla, gli animali possono essere divisi in due gruppi principali: animali poichilotermi e animali omeotermi.

I primi non hanno i mezzi fisiologici per generare calore: la temperatura corporea di questi animali tende a conformarsi a quella dell'ambiente esterno in assenza di qualsiasi intervento comportamentale. Compatibilmente a questa descrizione vengono definiti animali ectotermi. I comportamenti di termoregolazione utilizzati vanno dai più basilari quali la ricerca di habitat freddi o caldi che permettono all'animale di alterare il suo tasso di perdita o guadagno di calore fino ai più complessi quali la creazione di nidi o tane (Terrien et al., 2011) oppure comportamenti sociali (Batchelder et al., 1983). Esempi di poichilotermi includono gli animali "a sangue freddo" (Kearney et al., 2009), come la maggior parte dei pesci, degli anfibi e dei rettili.

Gli animali omeotermi, invece, hanno specifici adattamenti fisiologici per regolare la loro temperatura corporea. Ciò viene raggiunto attraverso la regolazione della perdita (termodispersione) e della produzione (termogenesi) di calore, al fine di contrastare qualsiasi cambiamento rilevante al di sotto o al di sopra dei valori fisiologici normali, principalmente indotti da variazioni della temperatura ambientale. Il sistema di termoregolazione riunisce quindi diversi organi termoeffettori anatomicamente non correlati e utilizza le loro risposte termoeffettive per mantenere costante la temperatura corporea e per adattarla alle condizioni interne ed ambientali a seconda delle necessità (Romanovsky, 2018). Infatti, le temperature corporee di questi animali non fluttuano tanto quanto quelle dei poichilotermi ma si mantengono nell'intervallo da 36 a 42°C (Ivanov, 2006). A questo gruppo fanno parte gli animali "a sangue caldo", come uccelli e mammiferi. Questi animali sono per lo più endotermi, poiché dipendono dal proprio metabolismo per riscaldare il proprio corpo.

Un terzo gruppo di animali, chiamati eterotermi, è in grado di passare tra l'omeotermia e la poichilotermia e di entrare in uno stato regolato particolare, chiamato torpore o ibernazione.

1.1.1. Controllo centrale della termoregolazione

Il modello attuale di controllo della temperatura corporea comprende la via termocettrice, che ha il compito di raccogliere informazioni relative alla temperatura corporea e inviarle ai centri termoregolatori situati nella regione preottica dell'ipotalamo (POA), e quella termoeffettrice che invece attua la risposta regolatoria dopo avere integrato le diverse informazioni termiche (Morrison, 2016).

I centri termoregolatori del sistema nervoso centrale ricevono segnali sia da termocettori centrali che da termocettori periferici, i quali sono localizzati prevalentemente a livello di cute, visceri e cervello e sono in grado di percepire la temperatura grazie a canali ionici appartenenti alla famiglia *Transient Receptor Potential* (TRP). Tra questi, particolare rilevanza hanno le isoforme coinvolte nella percezione del freddo (TRPM8) e del caldo (TRPV1,2,3) (Wetsel, 2011). I recettori cutanei sensibili al caldo e al freddo trasmettono i segnali ai neuroni sensoriali termici nel corno dorsale (DH) del midollo spinale, determinando la percezione termica (Craig, 2002). I neuroni sensoriali del freddo attivano i neuroni del nucleo parabrachiale dorsolaterale (LPBel), mentre quelli del caldo si proiettano nel nucleo parabrachiale dorsomediale (LPBd; (Morrison, 2018)).

Il nucleo parabrachiale laterale (LPB), situato nel ponte, agisce come centro di integrazione per gli stimoli somatici e viscerali che poi modulano l'attività dell'area preottica (POA) dell'ipotalamo, un importante centro integratore termoregolatorio in cui si possono distinguere l'area preottica media (MnPO) e l'area preottica media (MPA) (Nakamura & Morrison, 2010). Gli stimoli termici, infatti, vengono trasmessi agli interneuroni dell'MnPO che inducono attivazione o inibizione, a seconda che lo stimolo sia rispettivamente caldo o freddo,

della popolazione dei neuroni sensibili al caldo a livello dell'MPA, dando origine alla via termoeffettrice (Nakayama et al., 1963). In particolare, lo stimolo del freddo, per mezzo di interneuroni GABAergici, inattiva i neuroni sensibili al caldo, tonicamente attivi, determinando la disinibizione dell'ipotalamo dorso mediale (DMH) e quindi del Raphe Pallidus (RPa), sede dei premotoneuroni simpatici che controllano l'attività dei termoeffettori. L'attivazione di RPa induce l'attività termogenetica nel tessuto adiposo bruno (BAT), la modifica del flusso sanguigno (vasocostrizione) e contrazioni muscolari da brividi. Al contrario, gli stimoli caldi attivano i neuroni sensibili al caldo che inibiscono la termogenesi (Morrison, 2016) e promuovono la termodispersione (vasodilatazione, sudorazione).

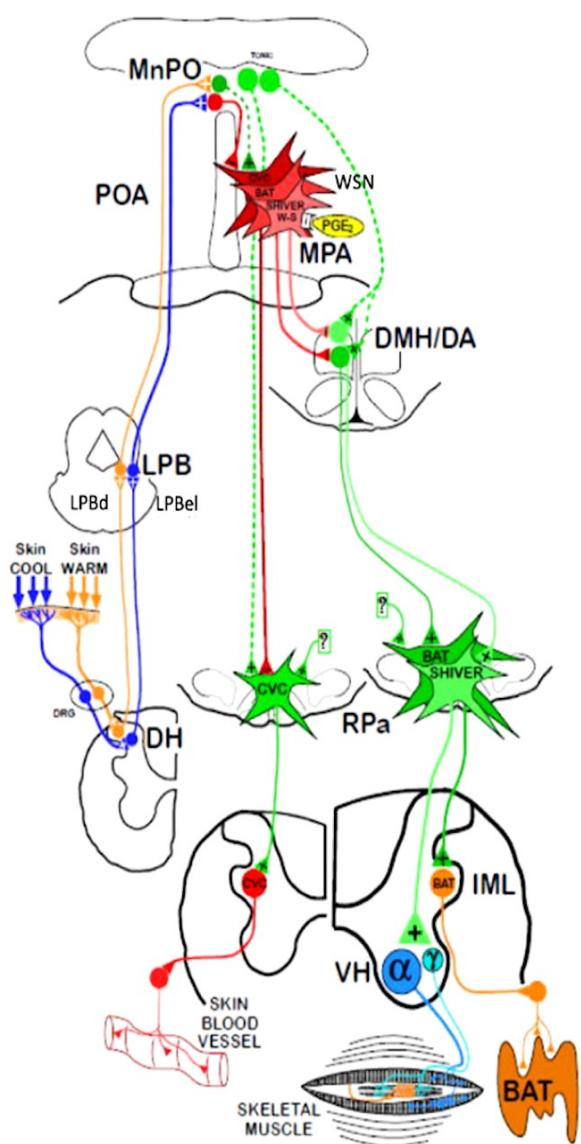


Figura 1: Controllo nervoso della termoregolazione (immagine modificata da Morrison (2016))

L'immagine illustra il modello neuroanatomico delle principali vie nervose che contribuiscono al controllo termoregolatorio attraverso la modificazione del flusso sanguigno, la termogenesi da brivido e quella del tessuto adiposo bruno (BAT). DH (corno dorsale), LPB (nucleo parabrachiale laterale), LPBel (nucleo parabrachiale dorsolaterale), LPBd (nucleo parabrachiale dorsomediale), POA (regione preottica dell'ipotalamo), MnPO (area preottica mediale), MPA (area preottica mediale), DMH (ipotalamo dorso mediale), Rpa (Raphe Pallidus) e BAT (tessuto adiposo bruno) (Morrison, 2016).

1.2. TORPORE NATURALE

Il torpore è un fenomeno fisiologico caratterizzato da una temporanea e transitoria diminuzione del tasso metabolico, cui segue tipicamente una riduzione della temperatura corporea e di altre funzioni fisiologiche (Geiser, 2004). Si tratta di una strategia di sopravvivenza, che permette un notevole risparmio energetico in condizioni ambientali sfavorevoli, come la scarsità di cibo o il freddo. Diverse specie animali sono in grado di entrare in questa condizione di ipotermia e ipometabolismo in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli. Infatti, il torpore si manifesta con vari modelli e frequenze in tutto il regno animale: troviamo specie appartenenti a 10 ordini di mammiferi (Geiser, 2004) e 12 famiglie di uccelli (McKechnie & Lovegrove, 2002). Osservando la diffusione eterogenea delle specie che ibernano, si può ipotizzare che questa caratteristica sia stata ereditata da un protomammifero comune. Pertanto, è probabile che la capacità di entrare in torpore sia stata poi persa in molti mammiferi, ma sia stata mantenuta nelle specie che potevano trarre vantaggio dal risparmio energetico per far fronte ad ambienti estremamente freddi e scarsità di risorse. Questo potrebbe indicare che il pool genico richiesto per il torpore sia ancora presente e conservato in tutti i mammiferi, compresi gli esseri umani, ma che i meccanismi di regolazione non vengano più reclutati (Cerri, 2017).

Gli omeotermi possono manifestare tre principali stati di ipometabolismo: ibernazione, torpore giornaliero ed estivazione. Tutte e tre le condizioni sono caratterizzate dalla riduzione del tasso metabolico, che si suppone avvenga con meccanismi centrali analoghi. Tuttavia la distinzione tra questi stati è rappresentata dalle condizioni in risposta alle quali avvengono (freddo – torpore giornaliero e ibernazione – e caldo – estivazione) e differenze nel tempo, nella durata e nell'estensione dell'inibizione fisiologica (Heldmaier et al., 2004).

La riduzione del tasso metabolico non è una conseguenza naturale secondaria della riduzione della temperatura, ma piuttosto una riduzione che inizia prima della effettiva diminuzione della temperatura corporea, suggerendo che non si tratti semplicemente di una riduzione passiva dell'attività enzimatica indotta dal freddo, ma sia un processo attivo e finemente regolato. Il torpore non solo riduce la spesa energetica, ma fornisce anche altri benefici: facilita il risparmio energetico per la migrazione in alcune specie di uccelli (Carpenter & Hixon, 1988); svolge un ruolo nelle strategie riproduttive; è una strategia di risparmio idrico; e in ultima analisi è associato a una riduzione del rischio di estinzione (Geiser & Brigham, 2012).

1.2.1. Torpore giornaliero

Tipicamente, in risposta ad una bassa temperatura ambientale e/o scarsità di risorse alimentari alcuni animali mostrano brevi episodi di torpore, definito *torpore giornaliero*, di durata inferiore alle 24 ore. Un esempio di quest'ultimo è il topo (*Mus musculus*) (Hudson & Scott, 1979), che può occasionalmente manifestare il torpore giornaliero. Tuttavia, in altre specie il torpore giornaliero è un processo obbligatorio che dipende dalla lunghezza del fotoperiodo, come ad esempio nel criceto siberiano (*Phodopus sungorus*) (Ruf et al., 1993).

Durante questi episodi, gli animali riducono il loro tasso metabolico, arrivando al 25% rispetto al loro tasso metabolico basale mentre la temperatura corporea diminuisce solitamente fino a circa 18 °C (come nei piccoli marsupiali carnivori e i topi) (Staples, 2016). Dopo qualche ora di torpore, l'animale recupera e torna allo stato eutermico (risveglio o *arousal*) per poi ritornare in torpore qualora le condizioni ambientali non siano migliorate.

La predilezione del torpore giornaliero (che garantisce un risparmio energetico giornaliero del 60% contro il 90% dell'ibernazione) può essere dovuta al fatto che esso permette di mantenere le attività territoriali e sociali, a differenza dell'ibernazione che necessita dell'accumulo di risorse energetiche e del ritiro in tane e rifugi termicamente stabili, implicando l'interruzione delle attività sociali e riproduttive. Inoltre, gli animali che utilizzano il torpore giornaliero possono regolare il loro fabbisogno energetico quotidianamente, sulla base della disponibilità di cibo o della presenza di situazioni avverse (Heldmaier et al., 2004).

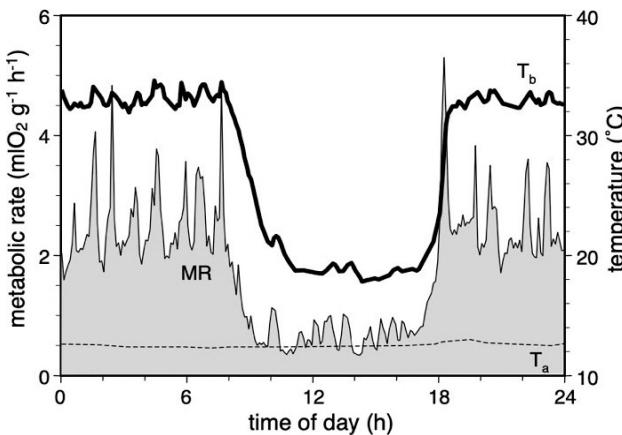


Figura 2: Torpore giornaliero nel criceto siberiano (*Phodopus sungorus*)

Immagine rappresentativa dell'andamento del tasso metabolico (MR) e della temperatura corporea (T_b) di un criceto siberiano nell'arco di 24 ore durante un episodio di torpore. È possibile apprezzare come alla fine del periodo di attività notturna (periodo di luce dalle ore 8 alle 16) diminuisca il metabolismo e la temperatura dell'animale (torpore) per poi ritornare a valori normali eutermici a fine giornata prima del suo periodo di attività notturna (Heldmaier et al., 2004).

1.2.2. Iberazione

L'ibernazione è una strategia di sopravvivenza utilizzata principalmente durante la stagione invernale. È caratterizzata dal susseguirsi di singoli episodi di torpore, ciascuno della durata di circa una-due settimane, intervallati da brevi periodi di normotermia (chiamati risvegli o *arousals*) (Wilz & Heldmaier, 2000). L'ibernazione è caratterizzata da tassi più pronunciati di ipometabolismo e ipotermia rispetto al torpore giornaliero: la riduzione del tasso metabolico è così importante da permettere di risparmiare circa il 90 % del fabbisogno energetico giornaliero mentre la temperatura nella maggior parte dei casi scende sotto i 10 gradi, avvicinandosi allo zero.

Si possono distinguere gli ibernanti obbligati, che stagionalmente e spontaneamente entrano in questo stato, e gli ibernanti facoltativi, che invece adottano questa strategia solamente in risposta a condizioni ambientali avverse (Heldmaier et al., 2004). La marmotta è un esempio di ibernante obbligato (come il ghiro), la cui ibernazione può iniziare verso la fine di settembre o i primi di ottobre e durare fino alla fine di marzo o agli inizi di aprile. La lunghezza media del singolo evento di torpore nelle marmotte è di circa 12 giorni, anche se questo si può allungare in pieno inverno, mentre l'intera stagione di ibernazione arriva a durare 6-7 mesi. La temperatura corporea della marmotta rimane sempre 1.5-3 °C al di sopra di quella ambientale.

Il susseguirsi di molteplici cicli di torpore-arousal è energeticamente molto costoso. Nella marmotta, circa il 70% di tutte le riserve energetiche necessarie per l'intera stagione di ibernazione viene utilizzato durante gli arousal e i periodi eutermici e per questo motivo vi è un risparmio maggiore di energia quando la durata del torpore profondo è estesa. Tuttavia, nonostante siano state proposte alcune teorie in merito, come la necessità di eliminare i prodotti del catabolismo o risintetizzare alcune sostanze, ancora non è chiaro il perché gli animali ibernanti debbano periodicamente ritornare alla normotermia e non possano mantenersi in uno stato di torpore per tutta la stagione di ibernazione (Heldmaier et al., 2004).

La massa corporea degli animali ibernanti (soprattutto di quelli obbligati) è maggiore rispetto agli animali che mostrano torpore giornaliero (Ruf & Geiser, 2015). Ciò potrebbe essere spiegato dal fatto che mentre i termoregolatori giornalieri cercano e mangiano frequentemente cibo durante il risveglio, gli ibernanti si affidano solo al loro grasso endogeno, accumulato durante l'estate: gli animali più grandi sono in grado di accumulare più grasso; un piccolo animale ha una riserva di grasso molto limitata e che non sarebbe sufficiente per sostenere periodi di torpore molto lunghi.

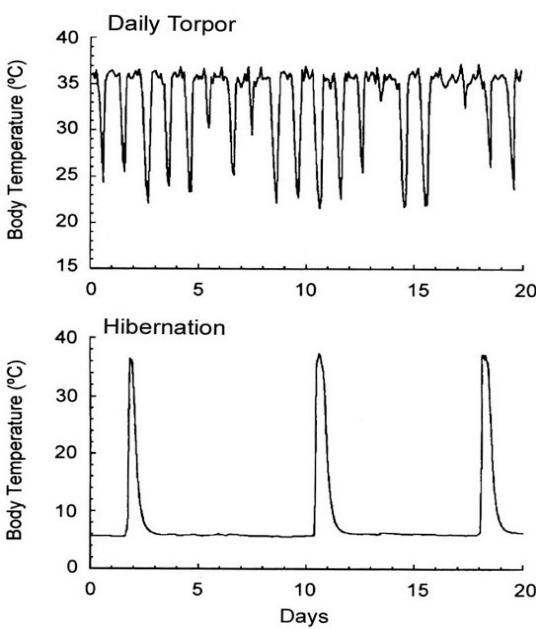


Figura 3: Confronto dell'andamento della temperatura corporea nel torpore giornaliero e nell'ibernazione (immagine modificata da Ruby (2003))

Nei grafici sono messe a confronto le temperature corporee nel torpore giornaliero in un criceto siberiano (pannello in alto) e nell'ibernazione in uno scoiattolo di terra dorato (pannello in basso) per 20 giorni in pieno inverno. Mentre il torpore giornaliero solitamente dura alcune ore, l'ibernazione è il risultato della somma di singoli episodi di ipotermia, della durata di alcuni giorni, intervallati da brevi periodi di normotermia (“arousals”), e può avere una durata complessiva di alcuni mesi (Ruby, 2003).

1.2.3. Adattamenti del torpore naturale

Durante il torpore naturale, molti organi e sistemi mostrano importanti modificazioni cellulari e sistemiche in risposta alla condizione ipometabolica e ipotermica.

Ad esempio, la diminuzione della richiesta metabolica si accompagna ad una diminuzione del consumo di ossigeno a causa della riduzione del processo di respirazione mitocondriale (Heldmaier et al., 2004) e quindi della produzione di energia, che viene principalmente da riserve lipidiche piuttosto che glucidiche. In questo contesto, la cellula riduce la propria proliferazione, coerentemente con la riduzione dell'attività di trascrizione e traduzione.

Interessante notare come le cellule, durante il torpore, mostrino una maggiore resistenza allo stress: infatti, periodi prolungati a basse temperature possono essere stressanti per le cellule a causa degli effetti su processi come la stabilità delle proteine, la funzione delle membrane, la sintesi dell'ATP, l'attività di enzimi regolatori chiave e l'integrità del citoscheletro. Oltre allo stress termico, si osservano anche meccanismi di resistenza allo stress metabolico che possono derivare dalla bassa perfusione dei tessuti durante il torpore, così come dalla mancanza di fonti dietetiche di antiossidanti e i loro precursori, che contrastano lo stress ossidativo (Carey et al., 2000).

Questa panoramica di mutamenti a livello cellulare pone le basi degli adattamenti che si osservano a livello sistematico e degli organi annessi.

Il cervello, per esempio, è tra gli organi che mostrano i cambiamenti più importanti durante il torpore. In particolare, l'entrata in torpore è associata al riassorbimento di più della metà delle sinapsi, che non è dovuta alla perdita di proteine ma alla dissociazione di queste dal citoscheletro; ciò crea una riserva di proteine che poi verranno rapidamente mobilitate per permettere la ricostruzione delle sinapsi durante il ritorno all'eutermia (Von Der Ohe et al., 2007). Questo fenomeno rappresenta un meccanismo di adattamento per consentire un notevole risparmio energetico durante il periodo di torpore e avviene parallelamente alle dinamiche di fosforilazione (durante l'ipotermia) e successiva defosforilazione (al recupero dell'eutermia) della proteina Tau, importante elemento costitutivo del citoscheletro, suggerendo un legame tra la plasticità sinaptica e la kinetica della fosforilazione della Tau (Arendt et al., 2003).

Un altro importante adattamento che si verifica durante il torpore riguarda l'apparato muscolo-scheletrico. È

stato osservato che gli animali durante il torpore non soffrono di atrofia muscolare né di demineralizzazione ossea, bensì mantengono un rimodellamento osseo equilibrato e preservano la struttura e la forza muscolare, nonostante i lunghi periodi di immobilizzazione (Reilly & Franklin, 2016). Ciò si verifica, con qualche eccezione nell'entità del livello di protezione, sia nei piccoli (es. scoiattoli, (Andres-Mateos et al., 2012)) che nei grandi (es. orsi (Harlow et al., 2001)) ibernanti. Si può affermare che il muscolo scheletrico affronti due contraddizioni durante il periodo eterotermico invernale: la prima è la necessità di mantenere la funzionalità contrattile per l'eccitazione e l'emergenza primaverile, seppur inattivando la contrattilità sia durante le fasi di ingresso che di mantenimento del torpore; la seconda è la necessità di catabolizzare i combustibili locali per i brividi e la locomozione, seppur limitando l'atrofia tissutale. Pertanto, il muscolo scheletrico dell'ibernante deve essere in grado di regolare il risparmio energetico durante l'inattività prolungata, le esigenze motorie transitorie dei periodi di eccitazione invernale e l'attività prolungata dopo l'emergenza primaverile (Hindle et al., 2011).

Un altro peculiare adattamento riguarda un altro tipo di muscolo, il muscolo cardiaco. La frequenza cardiaca diminuisce durante l'ingresso in torpore e aumenta, ritornando alla normalità, al risveglio dal torpore (Swoap & Gutilla, 2009). Tuttavia, la pressione sistolica, diastolica e arteriosa media diminuiscono solo del 25-30% durante il torpore. Il mantenimento della pressione sanguigna a valori solo del 25-30% inferiori rispetto a quelli osservati negli eutermici, nonostante la bradicardia profonda, suggerisce un'incrementata resistenza vascolare. Questo suggerisce che durante il torpore si verifichi un'attivazione simultanea del sistema nervoso simpatico e parasimpatico con il primo che induce vasocostrizione e il secondo che induce bradicardia. L'attivazione simultanea di entrambi i rami simpatici e parasimpatici del sistema nervoso autonomo è stata proposta come un mezzo per ottimizzare la funzione cardiaca quando si pompa sangue in un albero vascolare (Paton et al., 2005). La soppressione metabolica associata al torpore consente agli animali di tollerare profonde riduzioni del flusso cardiaco, della frequenza respiratoria e, presumibilmente, della perfusione degli organi.

Anche la funzione renale durante il torpore risulta profondamente modificata. Gli animali ibernanti stagionali urinano durante i risvegli periodici dal torpore. Questa urina viene prodotta solo al risveglio, indicando che i reni non producono urina alle temperature corporee più basse (Moy, 1971; Pengelley & Fisher, 1961). Si presume generalmente che, a causa della riduzione profonda del flusso cardiaco durante il torpore, i reni siano ischemici e che un qualche fattore intrinseco li protegga dal danno causato dall'ischemia. È importante considerare che il rene è freddo e inattivo, con ridotta filtrazione glomerulare, il turnover proteico cellulare presumibilmente è molto basso con scarsa formazione di prodotti di scarto azotati, e quindi il flusso sanguigno richiesto per mantenere l'equilibrio metabolico ed evitare l'ischemia sarebbe drasticamente ridotto rispetto al rene eutermico (Jani et al., 2013).

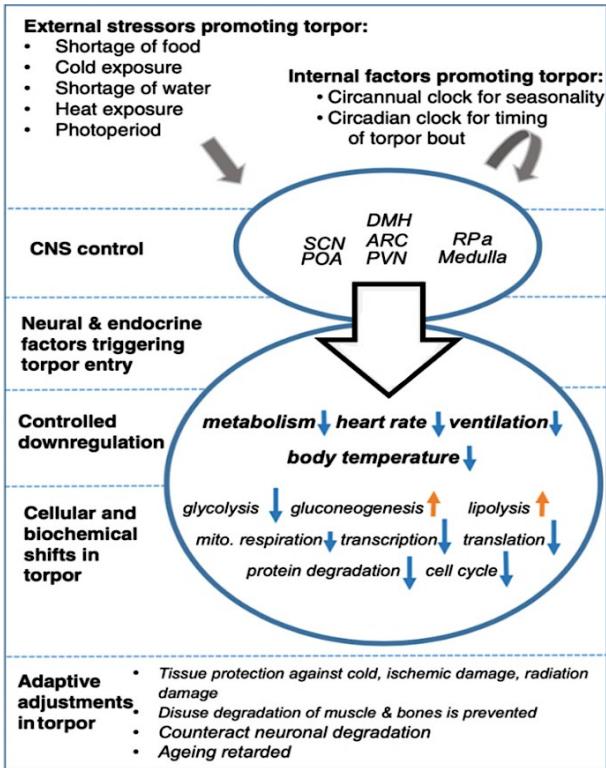


Figura 4: Substrato nervoso delle modifiche fisiologiche durante il torpore nei mammiferi (immagine modificata da Choukèr et al (2019))

L'immagine rappresenta come i fattori interni ed esterni promuoventi il torpore agiscano centralmente, coinvolgendo un discreto quantitativo di nuclei cerebrali, per apportare modifiche a livello cellulare e sistemico (metabolismo, ventilazione, frequenza cardiaca e temperatura) e conferire maggiore protezione nei confronti di agenti stressogeni incidenti. POA (area preottica), SCN (nucleo soprachiasmatico), PVN (nucleo paraventricolare), ARC (nucleo arcuato), DMH (ipotalamo dorsomediale), RPa (nucleo raphe pallidus) (Choukèr et al., 2019).

1.2.4. Brumazione ed Estivazione

L'estivazione è un tipo di ipometabolismo che consente la sopravvivenza durante periodi caldi e aridi, spesso associati a carenza di cibo e incompatibili con l'attività vitale. Questa strategia adattativa viene utilizzata da alcuni pesci, anfibi, rettili e piccoli mammiferi. Durante l'estivazione, il metabolismo corporeo si basa principalmente sull'ossidazione aerobica dei grassi, insieme al catabolismo proteico, con un piccolo contributo dei carboidrati. Il tasso metabolico si riduce fino al 10-30% rispetto a quello basale, più basso è il tasso metabolico, più a lungo può durare l'estivazione (Storey & Storey, 1990).

L'estivazione è caratterizzata da inattività e digiuno. Durante questa fase, i tessuti inattivi, come i muscoli scheletrici e quelli del tratto gastrointestinale, subiscono una regressione, contribuendo così alla riduzione del tasso metabolico (Secor & Lignot, 2010).

La brumazione, invece, avviene negli animali ectotermi (a sangue freddo) quando la temperatura scende per periodi prolungati e gli animali non hanno accesso ad una fonte di calore; è principalmente osservata nei rettili e negli anfibi (Cerri et al., 2016).

La durata del periodo di brumazione varia tra le diverse specie, può durare da 3 a 6 mesi e lo stato letargico del rettile o dell'anfibio si interrompe al rialzo della temperatura ambientale.

1.3. CONTROLLO CENTRALE DEL TORPORE

Il torpore è una strategia di conservazione dell'energia, utilizzata durante periodi di carenza di risorse. Pertanto, richiede una coordinazione complessa, che deve integrare informazioni sul bilancio energetico e sull'ambiente esterno per poi modulare l'attività metabolica e comportamentale dell'organismo. Poiché il sistema nervoso autonomo controlla il bilancio energetico complessivo, la regolazione fisiologica dell'inizio (tramite il ramo parasimpatico) e del risveglio (tramite il ramo simpatico) dal torpore probabilmente si basa su modifiche indotte dal sistema nervoso autonomo tra cui la riduzione della frequenza cardiaca e respiratoria ed il consumo di ossigeno (Drew et al., 2007; Milsom et al., 1999). I meccanismi alla base della regolazione del torpore non

sono ancora stati chiariti; tuttavia recentemente, alcuni studi hanno iniziato a identificare alcune vie nervose e aree cerebrali potenzialmente responsabili dell'entrata in torpore, evidenziando in particolare il ruolo giocato da alcuni nuclei del sistema nervoso centrale che sono coinvolti nei processi termoregolatori descritti in precedenza. Nella porzione anteriore e ventrale della POA, infatti, sono presenti un gruppo di neuroni GABAergicici e glutammatergici sensibili alla temperatura che potrebbero essere in grado di regolare la temperatura corporea sulla base della temperatura ambientale percepita, e che riattivati farmacologicamente, sono in grado di indurre uno stato ipotermico simile al torpore nel topo (Hrvatin et al., 2020; Takahashi et al., 2020).

È plausibile che altre aree coinvolte nella termoregolazione siano coinvolte anche nel fenomeno del torpore: in particolare il RPa è un'area chiave nella via efferente termogenica e si presume sia inibito per sopprimere la produzione di calore e consentire la perdita di calore necessaria per l'ingresso nel torpore.

1.4. TORPORE SINTETICO

Il torpore è un fenomeno che si è manifestato molto precocemente nella filogenesi animale ed è ben conservato nella classe dei mammiferi; quindi è possibile che ogni mammifero possieda il patrimonio genico necessario per entrare in questo stato, anche se in alcuni la capacità di attivarlo potrebbe essere stata persa a causa di uno svantaggio evolutivo. Questo suggerisce la possibilità di indurre uno stato simile al torpore in mammiferi non ibernanti, denominato torpore sintetico (TS), ovvero una condizione di soppressione metabolica reversibile, indotta artificialmente (Cerri, 2017). Questo è un tema di grande interesse per la comunità scientifica grazie alle sue molteplici applicazioni traslazionali e cliniche: lo stato ipometabolico potrebbe infatti risultare vantaggioso in tutti quegli stati che potrebbero beneficiare di una riduzione del consumo di ossigeno, sia in ambito medico (es. infarto, emorragia), che scientifico (es. espolorazione spaziale).

A tale scopo, sono stati studiati e proposti diversi metodi per indurre il TS. Tra questi, ricordiamo la somministrazione dell'acido solfidrico (H_2S) e il 5'-adenosin monofosfato (5'-AMP).

L' H_2S è una molecola endogena, prodotta naturalmente in piccole quantità. Si tratta di un potente inibitore del complesso IV (citocromo-c ossidasi) della fosforilazione ossidativa nel mitocondrio, anche implicato nell'attivazione di sistemi anti-apoptotici e in meccanismi antiossidanti. La combinazione di queste proprietà rende l' H_2S un promettente candidato per indurre il torpore.

È stato dimostrato che l'esposizione ad H_2S gassoso produce nel topo un abbassamento del metabolismo cellulare e della temperatura corporea (Blackstone et al., 2005). Tuttavia, esperimenti condotti in altri animali non hanno però confermato la capacità dell' H_2S di indurre uno stato simile al torpore. È possibile ipotizzare che l'uso del topo come modello sperimentale possa non essere stata la scelta ottimale per questo approccio sperimentale in quanto il topo è un eteroterna facoltativo, ed è quindi in grado, nelle adeguate condizioni, di entrare in torpore, che potrebbe in questo caso essere stato utilizzato come meccanismo di sopravvivenza e non dipendere dalla somministrazione di H_2S .

Un'altra molecola promettente è il 5'-AMP, un metabolita derivato dall'idrolisi dell'ATP, proposto come possibile induttore di uno stato simile al torpore nel topo. In condizioni di digiuno e di buio costante, la somministrazione di 5'-AMP ha indotto nel topo uno stato simile al torpore, accompagnato da severa bradicardia. Esistono due ipotesi che possono spiegare gli effetti farmacologici del 5'-AMP: la prima suggerisce che il 5'-AMP defosforilato ad adenosina attivi i recettori dell'adenosina e porti ad una riduzione del rendimento cardiaco, e di conseguenza ad una riduzione di temperatura; la seconda invece suggerisce che l'assorbimento di 5'-AMP possa portare all'attivazione dell'AMP proteina chinasi (AMPK), un enzima chiave coinvolto nella regolazione del metabolismo (Bouma et al., 2012).

Oltre a quelli nominati, sono stati proposti altri approcci farmacologici per indurre il TS, tuttavia non sono stati ottenuti risultati di rilievo, in quanto spesso queste sostanze non hanno ottenuto l'effetto desiderato o agiscono

su numerosi bersagli, causando degli effetti collaterali importanti.

Attualmente le strategie più promettenti per indurre il TS si basano sulla manipolazione del sistema nervoso centrale. Tra le più efficaci vi sono l'inibizione dei neuroni del Raphe Pallidus (RPa) (Cerri et al., 2013) e l'attivazione dei recettori centrali dell'adenosina A1 (A1R) (Tupone et al., 2013).

Come detto in precedenza, il RPa è la sede dei premotoneuroni simpatici che controllano gli effettori termoregolatori (BAT, brivido e vasomozione); quando attivo, porta alla loro attivazione, promuovendo la termogenesi. Per cui è plausibile che durante il torpore, nonostante lo stimolo periferico sensoriale freddo, l'RPa sia essere inattivo. L'inibizione prolungata del RPa attraverso microiniezioni ripetute dell'agonista del recettore GABA_A (muscimolo) è stata sufficiente a causare uno stato di ipotermia profonda nel ratto (animale non ibernante) esposto a bassa temperatura ambientale, accompagnato da una profonda riduzione della frequenza cardiaca e dell'attività elettroencefalografica, pur mantenendo i normali parametri di pressione arteriosa (Cerri et al., 2013).

Un altro meccanismo di induzione del TS che si basa sulla manipolazione del sistema nervoso centrale è l'attivazione dei recettori centrali A1 dell'adenosina (A1R), la cui efficacia probabilmente risiede nell'attivazione dei neuroni all'interno del nucleo del tratto solitario (NTS) (Tupone et al., 2013). La fenomenologia dei cambiamenti autonomici indotti dall'attivazione centrale dell'A1R differisce, però, da quella osservata dopo l'inibizione dei neuroni RPa. Infatti, dopo l'attivazione dell'A1R, la pressione arteriosa aumenta, mentre la frequenza cardiaca diminuisce molto rapidamente. Rispetto all'inibizione di RPa, che avviene attraverso ripetute somministrazioni nel parenchima cerebrale, l'attivazione degli A1R può essere ottenuta mediante iniezioni intracerebroventricolari di agonisti degli A1R.

Questo è un metodo più accessibile, ma un modo ancora più semplice per ottenere gli stessi effetti è somministrare l'agonista dell'A1R per via endovenosa. Tuttavia, l'attivazione sistematica dei recettori dell'adenosina comporta una varietà di effetti collaterali, soprattutto sul cuore. Al contrario, l'inibizione del RPa causa pochi effetti collaterali cardiovascolari. Inoltre, rispetto all'attivazione dell'A1R, l'inibizione del RPa fornisce un significativo vantaggio: l'induzione di una grande vasodilatazione cutanea. Un tale effetto potrebbe essere utilizzato per indurre un'ipotermia più profonda e rapida.

1.4.1. Applicazioni traslazionali del torpore sintetico

L'induzione del TS in animali non ibernanti, come l'uomo, potrebbe fornire numerosi vantaggi in vari scenari applicativi, da quello clinico fino ad arrivare ai viaggi spaziali di lunga durata.

Nel trattamento dell'ictus, ad esempio, diminuirebbe il metabolismo neuronale, limitando quindi le dimensioni dell'area danneggiata, e potrebbe prolungare la finestra di intervento per l'uso di agenti trombolitici. Oppure, l'attivazione dell'A1R centrale nei pazienti con ictus potrebbe aumentare la pressione arteriosa, facilitando quindi la circolazione sanguigna attraverso circoli collaterali (Tupone et al., 2013). L'induzione del torpore sintetico potrebbe anche essere utile nei casi di ipossia sistemica, come l'arresto cardiaco o l'ipossia neonatale grave, condizioni in cui l'ipotermia terapeutica è già considerata vantaggiosa.

Per quanto concerne l'ambito dell'esplorazione spaziale, la riduzione del metabolismo indotta dal torpore sintetico ridurrebbe la quantità di cibo necessaria per la sopravvivenza dell'equipaggio per lunghi periodi; ridurrebbe anche il rischio di stress psicologico, a seconda che la profondità del torpore raggiunta interferisca con la coscienza. Inoltre, l'atrofia da disuso dei muscoli scheletrici e delle ossa sarebbe ridotta, e la resistenza al danno da radiazioni che si osserva in numerosi animali durante il torpore potrebbe rilevarsi utile nel contrastare i danni indotti dalle radiazioni cosmiche (Musacchia & Barr, 1968).

Infine, l'induzione del torpore sintetico ridurrebbe il metabolismo cellulare in modo sistematico, riducendo quindi la probabilità di insufficienza multiorgano (Angus & Van Der Poll, 2013) ed infine il suo studio potrebbe portare a capire come ripristinare la connettività cerebrale nei casi di perdita sinaptica (Von Der Ohe et al., 2006).

2. SCOPO

Il torpore o ibernazione è uno stato ipometabolico e ipotermico caratterizzato da profonde modificazioni dei normali processi fisiologici, che permette agli animali ibernanti di sopravvivere a periodi di scarsità di risorse o condizioni ambientali avverse. Di particolare interesse sono gli adattamenti del muscolo scheletrico, il quale, sorprendentemente, non va incontro all'usuale atrofia muscolare che si verifica dopo prolungati periodi di inattività, ma viene in larga parte preservato tramite meccanismi in gran parte sconosciuti.

A causa dei profondi adattamenti fisiologici a cui vanno incontro gli animali ibernanti, vi è un crescente interesse nell'indurre uno stato simile al torpore anche in animali non ibernanti, con potenziale traslazionale sia in ambito clinico che non. Attualmente, uno dei metodi più promettenti prevede l'inibizione centrale del nucleo termoregolatorio Raphe Pallidus, che induce nei ratti (animali non ibernanti), uno stato di profonda ipotermia chiamato torpore sintetico (TS).

Questa tesi si propone di verificare i cambiamenti che avvengono a livello del muscolo scheletrico del ratto in seguito all'induzione del TS. In particolare, sono state valutate le alterazioni morfologiche dopo 8 ore di TS sia dal punto di vista istologico che ultrastrutturale. Inoltre, per caratterizzare meglio l'attivazione di eventuali risposte adattative al TS, è stata analizzata l'espressione genica del muscolo scheletrico, mettendo in evidenza il significato biologico dei geni maggiormente espressi rispetto alla condizione di controllo normotermica.

Approfondire lo studio di questo processo in animali non ibernanti potrebbe migliorare la nostra comprensione delle risposte cellulari al TS, permettendo di esplorarne la sicurezza e le potenziali applicazioni traslazionali nell'uomo. Inoltre, la caratterizzazione del trascrittoma del muscolo scheletrico in TS potrebbe fornire nuovi potenziali target terapeutici per contrastare l'atrofia muscolare da disuso.

3. MATERIALI E METODI

3.1. ANIMALI

Per l'esperimento sono stati utilizzati 8 ratti albini del ceppo Sprague-Dawley (Charles River) con un peso compreso tra i 150 e i 175 grammi, stabulati in coppia all'interno di gabbie in plexiglas (Techniplast) fornite di una lettiera depolverata. Gli animali sono stati tenuti per un periodo di adattamento di una settimana in condizioni standard di laboratorio: temperatura ambientale (Ta) di 24 ± 1 °C, un ciclo luce-buio (LD) di 12-12 ore, con mantenimento di 100 lux di intensità luminosa a livello della gabbia dalle 9:00 alle 21:00, e libero accesso ad acqua e cibo. Le loro condizioni di salute sono state monitorate regolarmente da un operatore specializzato prima e dopo le procedure chirurgiche. Tutti gli esperimenti sono stati autorizzati dal Ministero della Salute (D.lgs. 26/2014; DM 779/2017-PR) e svolti sotto la supervisione del Servizio Veterinario Centralizzato dell'Università di Bologna, minimizzando il più possibile il numero di animali utilizzati e la loro sofferenza.

3.2. PROCEDURE PREOPERATORIE

Nel laboratorio di Fisiologia del Sistema Nervoso Autonomo e del Comportamento dell'Università di Bologna è stato possibile ideare un apparato per microiniezioni sfruttabile in questo studio per le iniezioni cerebrali. L'apparato è composto da un tubo in teflon di 1 m di lunghezza e con un diametro costante di 0,2 mm (FEP-Tubing 4001005 10X1m Microbiotech/se AB, Stockholm, Sweden), alle cui estremità sono stati inseriti due connettori che permettono da un lato il collegamento con una siringa Hamilton da 5 µL (Hamilton Company, Bonaduz, Switzerland) e dall'altro con la microcannula interna, la quale viene poi inserita nella cannula guida utilizzata durante l'intervento.

Il tubo, prima di ogni sessione sperimentale e procedura chirurgica, viene riempito con la sostanza da iniettare. In un'estremità del tubo viene inserito del colorante, separato tramite uno strato di olio minerale dalla sostanza; infine, la siringa Hamilton viene caricata con dell'olio minerale e posizionata su di una pompa per microinfusione (Harvard Apparatus).

Per valutare il successo della microiniezione si osserva lo spostamento, nell'ordine dei millimetri, del colorante nel tubo.

3.3. CHIRURGIA

A seguito di una settimana di adattamento alle condizioni standard di laboratorio, i ratti sono stati sottoposti ad un intervento chirurgico. Per ottenere la sedazione pre-anestesia è stato somministrato Diazepam (Valium Roche, 5 mg/Kg intramuscolo) e successivamente è stata indotta l'anestesia generale mediante la somministrazione intraperitoneale di Ketamina Cloridrato (Lobotor, Acme S.r.l., 100 mg/Kg). Dopodiché è stata eseguita la tricotomia del cranio e la cute esposta è stata disinfeccata per evitare contaminazione batterica. L'animale è stato quindi posizionato su un apparato stereotassico (David Kopf Instruments) in cui la testa è stata bloccata mediante una barra di supporto trasversale per la mascella e due barre auricolari inserite delicatamente nei due meati acustici esterni.

Successivamente è stata utilizzata una lama chirurgica sterile per effettuare un'incisione della cute sulla linea mediana del cranio ed è stata effettuata la rimozione del periostio per rendere visibili le suture craniali, in funzione delle quali sono stati praticati quattro fori, con un diametro di 0,5mm, per permettere l'inserimento di quattro viti in acciaio inossidabile necessarie per mantenere in sede gli impianti: due fori sono stati fatti in posizione antero-laterale sulle ossa frontali destra e sinistra, e due in posizione postero-laterale sulle ossa parietali destra e sinistra. È stato poi effettuato un foro delle stesse dimensioni in prossimità dell'ipotalamo anteriore sinistro per inserire il termistore per la registrazione continua della temperatura cerebrale. Sull'osso occipitale, in corrispondenza del Raphe pallidus, è stata rimossa una piccola porzione di osso in modo da

esporre la dura madre e inserire la microcannula guida (C315G-SPC, Plastics One; estensione della cannula interna dalla sua base di +3,5 mm). Le coordinate del RPa sono state ottenute seguendo l'atlante *"The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates"* (Paxinos & Charles Watson, 2007) e sono le seguenti: -3/-4 mm AP dal lambda; 0 mm LL; - 9/-9,7 mm dorso ventrale (DV) dalla superficie della dura madre.

Il corretto posizionamento della cannula guida è stato confermato tramite un test funzionale che prevede l'iniezione di muscimolo (60 nl, 1mM), un agonista selettivo GABA_A, che esercita un'azione inibitoria sui neuroni del RPa tale da indurre una massiccia vasodilatazione (Cerri et al., 2010), che può essere evidenziata dall'aumento della temperatura superficiale della coda per mezzo di un termistore posizionato circa a un terzo della sua lunghezza. Il posizionamento della cannula guida è stato presunto corretto a seguito di un evidente aumento della temperatura della coda entro dieci minuti dall'iniezione di muscimolo. In mancanza di risposta, le coordinate dell'iniezione DV e LL sono state leggermente modificate e il test funzionale ripetuto fino all'ottenimento di un esito positivo. Dopo aver verificato il corretto posizionamento della cannula guida, è stata utilizzata una resina acrilica autopolimerizzante (ResPal, Salmoiraghi Produzione Dentaria) per ricoprire l'intero campo chirurgico e assicurare la stabilità di termistore, viti e cannula.

Al termine della procedura chirurgica, agli animali è stato somministrato per via intramuscolare un antibiotico ad ampio spettro (benzilpenicillina benzatinica 12.500.000 U.I., diidrostreptomicina solfato, Rubrocillina Veterinaria, Intervet -1 mL/kg) per prevenire infezioni post-operatorie e, per via sottocutanea, 5 mL di soluzione salina sterile per permettere la reidratazione e un analgesico sottocute (Rimadyl-Carprofene, Pfizer- 5 mg/kg) per evitare il dolore post-operatorio.

Gli animali sono poi stati riportati nelle gabbie di stabulazione, esposti alle condizioni standard di laboratorio, e sono stati controllati quotidianamente da operatori e veterinari per rilevare sintomi di dolore, angoscia o sofferenza utilizzando le tabelle di Humane End Point (HEP).

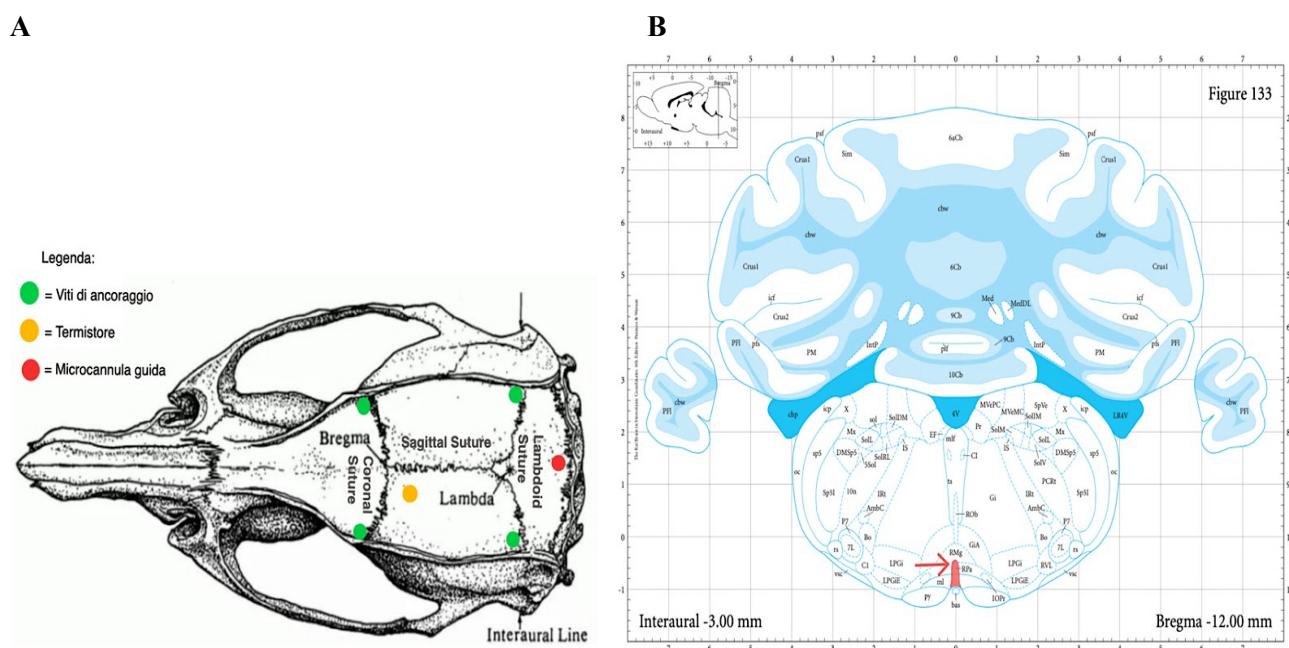


Figura 5: Posizionamento degli impianti e sede delle iniezioni

Nel pannello A è rappresentato un cranio di ratto in cui sono evidenziati i punti dove sono stati effettuati i fori per permettere l'impiego delle viti di ancoraggio (verde), termistore (giallo), microcannula guida (rosso). Il pannello B mostra una sezione coronale del cervello di ratto in cui viene evidenziato il Raphe Pallidus (Rpa; in rosa), sede delle microiniezioni dell'agonista GABA_A muscimolo (Immagine modificata da Paxinos and Watson (2007)).

3.4. PROTOCOLLO Sperimentale

3.4.1. Apparato di registrazione

Dopo 7 giorni di recupero post-operatorio, ciascun animale è stato spostato in una gabbia di plexiglass sperimentale ed esposto a condizioni ambientali favorevoli l'entrata in uno stato ipometabolico negli ibernanti: bassa temperatura ambientale (Ta di 15 °C) e buio continuo. Ciascuna gabbia sperimentale è stata collocata in un box termoregolato dove l'animale si trova singolarmente e separato dagli altri utilizzati nella stessa giornata sperimentale, per ridurre al minimo lo stress. Grazie all'ausilio di un cavo collegato ad un supporto oscillante (dotato di contatto rotante), è stato possibile collegare il termistore all'impianto di registrazione posto all'esterno del box, e quindi monitorare costantemente la temperatura centrale. Nello specifico, quest'ultima è stata registrata, amplificata (mod. Grass 7P511L, Astro-Med Inc, West Warwick (RI), USA) e filtrata (con un filtro passa-alto 0,5 Hz), per poi esser convertita dalla modalità analogica a digitale a 12 bit (CED Micro MK 1401 II) e salvata su un hard drive digitale.

3.4.2. Disegno sperimentale

Dopo 36 ore di adattamento alle condizioni sperimentali, gli animali sono stati suddivisi casualmente in due gruppi, ciascuno composto da quattro animali (n=4):

- IPO→ Gruppo ipotermico: gli animali hanno subito una microiniezione all'ora di muscimolo (1mM, 120 nL/hr) per indurre il TS. Questo ha innescato lo stato di TS, con il raggiungimento nell'arco di 8 ore di una temperatura cerebrale di $23,12 \pm 1,22$ °C (nadir ipotermico).
- NORM→ Controllo normotermico: gli animali hanno ricevuto una microiniezione all'ora di liquido cerebrospinale artificiale (a-CSF), con un volume uguale a quello usato nel gruppo ipotermico, osservando il mantenimento di una temperatura cerebrale tra i 37°C e i 38°C (Ta di 15°C).

A seguito della somministrazione di muscimolo o di a-CSF (la prima iniezione è stata effettuata alle ore 7:00 e l'ultima alle 15:00, per un totale di 8 ore di normotermia o ipotermia) gli animali sono stati sacrificati con un'overdose di anestetico (Lobotor, Parke-Davis) al fine di raccogliere 3 campioni di muscolo scheletrico (quadricep femorale), due destinati ad analisi istologiche e un campione destinato ad analisi di espressione genica.

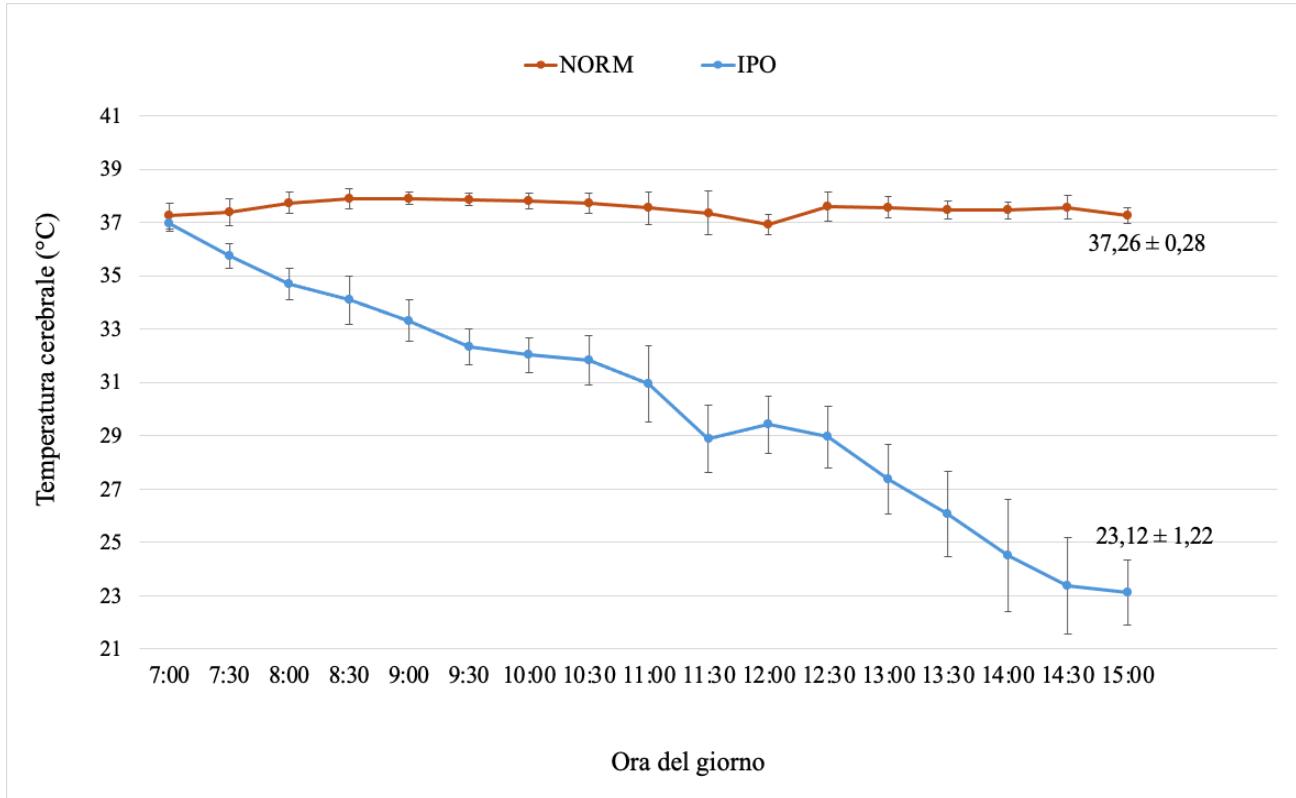


Figura 6: Andamento temporale della temperatura cerebrale del gruppo NORM e IPO durante la giornata sperimentale

Il grafico rappresenta il valore medio \pm SEM (errore standard della media) della temperatura cerebrale registrata ogni 30 minuti durante la giornata sperimentale. I ratti che hanno ricevuto microiniezioni di muscimolo agonista GABA_A sono rappresentati dalla curva IPO in azzurro, mentre i ratti che hanno ricevuto microiniezioni di a-CSF dalla curva NORM, in arancione.

3.5. ANALISI ISTOLOGICA

3.5.1. Microscopia ottica

Al termine dell'espianto, i campioni di muscolo scheletrico sono stati immediatamente immersi in paraformaldeide (PFA) al 4% (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), un fissativo in grado di mantenere l'integrità del campione, utile per le fasi successive, bloccando gli eventi autolitici cellulari del tessuto. Trascorse 24 ore alla temperatura di 4°C, è stato effettuato un lavaggio in tampone fosfato salino (PBS, 10mM) per eliminare l'eccesso di PFA ed evitare un eccessivo fissaggio e/o artefatti nella procedura di colorazione; sono stati, quindi, stoccati in etanolo al 70%. Al momento della processazione, i campioni sono stati sottoposti a disidratazioni per mezzo dell'utilizzo di alcoli a concentrazioni crescenti progressive e poi sono stati immersi in etanolo assoluto. Una volta fatto ciò hanno subito una purificazione in agente chiarificante (xilolo) per 30 minuti per poi essere incubati in paraffina liquida con un'apposita stufa termostatata. Trascorse sei ore in paraffina, è stata eseguita l'inclusione dei campioni in ulteriore paraffina e sono stati lasciati solidificare in blocchetti. Infine, è stato effettuato il taglio al microtomo ottenendo delle sezioni dello spessore di 4 µm, destinate alla colorazione con ematossilina ed eosina (E&E). Questa colorazione permette la valutazione qualitativa della morfologia istologica tissutale, al fine di identificare eventuali anomalie o alterazioni.

L'ematossilina (nome derivante dalla pianta da cui si estrae) è un colorante blu acido e di conseguenza è basofilo, in grado di colorare di blu i nuclei perché marca le porzioni basiche della cellula, ovvero le proteine

istomiche nel nucleo.

L'eosina prende il nome da "eos" (nome greco per alba, poiché questa è arancione) ed è un colorante basico (quindi acidofilo) in grado di colorare maggiormente ciò che è acido nella cellula, ovvero i citoplasmi e le porzioni intercellulari (stroma).

I due coloranti descritti sono in soluzione acquosa (idrofili) pertanto, per riuscire a colorare la sezione inclusa in blocchetti di paraffina, è stato necessario eseguire il procedimento opposto rispetto a quanto fatto per l'inclusione in paraffina: le sezioni sono state prima private della paraffina in xilolo, successivamente reidratate tramite lavaggi in serie in percentuale discendente di etanolo, partendo in questo caso dall'etanolo assoluto fino ad arrivare all'etanolo 50% e infine all'acqua. I campioni sono stati, quindi, posti per circa 5 minuti in una soluzione Emallume o ematossilina in modo tale da permettere il legame del colorante con i nuclei, in seguito è avvenuto il viraggio in acqua, ovvero il lavaggio in acqua di fonte che essendo leggermente alcalina consente il viraggio di colore dei nuclei da violaceo ad azzurrognolo. Infine è stata eseguita l'incubazione per 2 minuti nell'altro colorante eosina al 0,25% in modo da colorare il citoplasma.

È stato rimosso l'eccesso delle soluzioni coloranti attraverso dei lavaggi in acqua, per poi eseguire la disidratazione e chiarificazione in xilolo e la chiusura dei vetrini con DPX (montante in grado di preservare il campione). Una volta terminata la processazione dei campioni, è stata effettuata la valutazione citoistologica utilizzando il microscopio ottico e sfruttando lo scanner "Ventana DP 200" per l'acquisizione delle immagini rappresentative.

3.5.2. Microscopia elettronica

L'analisi istologica ultrastrutturale ha previsto l'utilizzo di un microscopio elettronico a trasmissione (TEM). A differenza del microscopio ottico, dotato di un ingrandimento che varia da 40x a 1000x e di una risoluzione limitata dalla lunghezza d'onda della luce del visibile, un microscopio elettronico utilizza fasci di elettroni focalizzati per illuminare il campione e permette di visualizzare dettagli molto più piccoli, dell'ordine dei nanometri.

Dopo il prelievo, un campione di muscolo scheletrico è stato immerso all'interno di una miscela di paraformaldeide al 4% e glutaraldeide all'1% in tampone fosfato 0,1M per 24 ore per favorire la penetrazione del fissativo. Successivamente, il tessuto è stato lavato in tampone fosfato 0,1M per poi essere stoccati nello stesso tampone alla temperatura di 4°C, in attesa di un ulteriore processamento e analisi.

Le fasi del protocollo che intercorrono tra la post-fissazione e l'acquisizione delle immagini sono state eseguite in collaborazione con il gruppo di ricerca della Prof. Faenza del Teaching Hub-Campus Forlì dell'Università di Bologna .

3.6. VALUTAZIONE DELL'ESPRESSIONE GENICA

3.6.1. Sequenziamento dell'RNA

Il sequenziamento dell'RNA (RNA-seq), attraverso l'accurata tecnica di sequenziamento di nuova generazione (NGS), rivela i profili di espressione genica e descrive le variazioni continue del trascrittoma.

Per effettuare l'analisi del trascrittoma sono stati prelevati piccoli frammenti di muscolo scheletrico ed immediatamente immersi in 600 µl di RNAlater (Ambion), un reagente di conservazione tissutale che serve a preservare la qualità e quantità dell'RNA cellulare. Trascorsi alcuni minuti a temperatura ambiente in modo da garantire la penetrazione dell'RNAlater nel tessuto, è avvenuta la conservazione a -80°C dei campioni, prima di procedere con il sequenziamento. La ditta specializzata che si è occupata di portare a compimento il sequenziamento dell'RNA è Sequentia Biotech, con sede a Barcellona.

Il protocollo di RNA-seq ha previsto diverse fasi: controllo di qualità, elaborazione delle letture e l'analisi statistica dei dati degli 8 campioni in esame. Per effettuare il controllo di qualità sono stati utilizzati i dati grezzi di sequenziamento ed in particolare è stata conservata solamente la porzione più lunga e di alta qualità delle

lettura NGS; il tutto è stato perfezionato e ultimato con il software BBduk, veloce e accurato, in grado tagliare e filtrare i dati di sequenziamento utilizzando una lunghezza minima impostata a 35 bp (paia di basi) e punteggio di qualità a 10.

L'allineatore STAR (versione 2.5.2b) è stato utilizzato per le letture di alta quantità sfruttando la sequenza del genoma di riferimento di *Rattus norvegicus* Rnor_6.0 (GCA_000001895.4). I valori di espressione genica, sotto forma di conteggi grezzi di frammenti, sono stati prodotti da Alignment FeatureCounts (versione 1.5.1). Per quanto concerne la normalizzazione, sono stati usati due metodi: la normalizzazione TMM (Trimmed Mean of M-values) e la normalizzazione FPKM (Fragments Per Kilobase Million). L'analisi statistica è stata eseguita con R tramite i pacchetti HTSFilter e NOISeq. NOISeq è un approccio non parametrico per l'analisi dell'espressione differenziale di RNAseq-data: crea una distribuzione nulla o di rumore dei cambiamenti di conteggio confrontando il numero di letture di ciascun gene in campioni all'interno della stessa condizione.

Il pacchetto HTSFilter invece è utile per scartare geni che mostrano troppa variabilità per ogni confronto e quelli non espressi. Questo pacchetto implementa una procedura di filtraggio per i dati di sequenziamento del trascrittoma replicato sulla base di un indice globale di somiglianza Jaccard.

Infine, per valutare la qualità e la coerenza dei campioni prelevati è stata utilizzata l'analisi delle componenti principali (PCA), un metodo di riduzione della dimensionalità utilizzato per semplificare un set di dati di grandi dimensioni in un set più piccolo pur mantenendo modelli significativi, usando come input i valori normalizzati di espressione genica.

3.6.2. Analisi Bioinformatica

Per valutare i geni differenzialmente espressi (DEGs) in seguito all'induzione del torpore sintetico rispetto ai ratti normotermici di controllo, è stato utilizzato DESeq2 ((Love et al., 2014) versione 1.37.6), un pacchetto software per il linguaggio di programmazione statistica R versione 4.2.1, disponibile attraverso Bioconductor (versione 3.15).

I geni differenzialmente espressi sono stati filtrati utilizzando come cut-off di valore p aggiustato (padj) 0,05 (risultati significativi inferiori a 0,05) e discriminati utilizzando il Fold change (FC), una misura che indica di quanto cambia l'espressione di un gene tra due condizioni. I geni con valori positivi di \log_2 FC sono stati considerati sovra-regolati mentre quelli con valori negativi di \log_2 di FC sono stati considerati sotto-regolati.

La visualizzazione dell'analisi di espressione genica differenziale è stata ottenuta tramite un volcano plot, un grafico a dispersione che mette in relazione il \log_2 del FC con il \log_{10} del False Discovery Rate ((FDR), una misura statistica corretta per il test multiplo che indica la probabilità che un gene identificato come differenzialmente espresso sia un falso positivo. Valori più alti sull'asse Y indicano una maggiore significatività statistica, mentre i punti più distanti dal centro sull'asse X (sia a destra che a sinistra) rappresentano i geni con i cambiamenti più rilevanti nell'espressione.

Tra i geni ottenuti dall'analisi bioinformatica sono stati presi in esame i primi 30 più sovra- e sotto-regolati. Per ciascuno di questi geni è stato studiato il significato biologico tramite una ricerca su databases quali Rat Genome Database (RGD), Gene cards, NCBI gene e Pubmed, prestando particolare attenzione alla loro presenza in lavori scientifici relativi ad ibernazione/torpore.

L'analisi bioinformatica descritta è stata effettuata in collaborazione con il laboratorio di Biologia Cellulare e dello Sviluppo dell'Università di Pisa.

4. RISULTATI

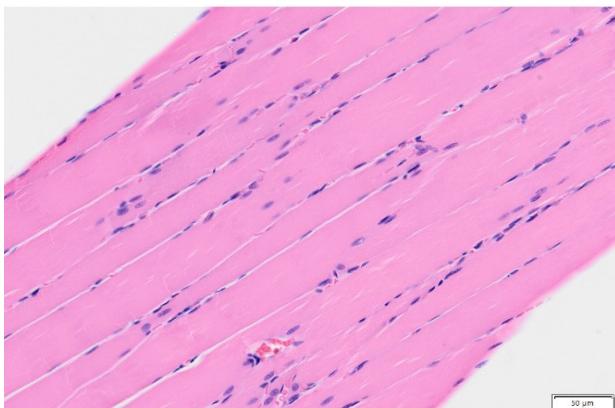
4.1. ANALISI ISTOLOGICA

4.1.1. Microscopia ottica

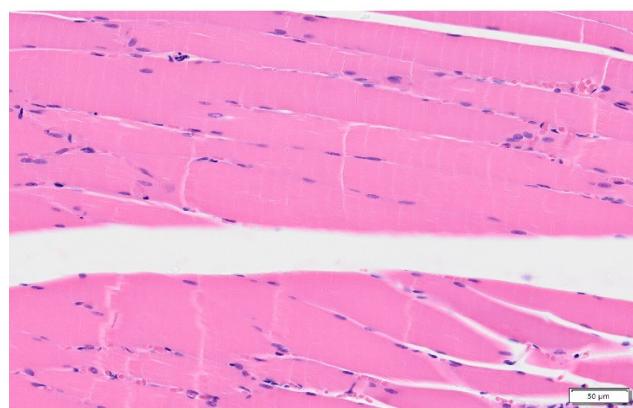
L'analisi istologica dei campioni di muscolo scheletrico effettuata tramite la colorazione ematossilina-eosina non ha evidenziato alterazioni cito-morfologiche tra i ratti normotermici (NORM) e ipotermici (IPO) (Figura 7). Infatti, in entrambi i gruppi sperimentali le fibre muscolari appaiono correttamente organizzate con nuclei localizzati ai margini cellulari. Non sono stati riscontrati segni di degenerazione muscolare, come evidenziato dall'assenza di lisi miofibrillare, di fibre eosinofile (che sono, invece, fortemente colorate con l'eosina in presenza di processi patologici quali necrosi) e di fibre ialine (ovvero fibre muscolari dall'aspetto traslucido, il quale può derivare da cambiamenti degenerativi). Infine, nel tessuto muscolare di entrambi i gruppi sperimentali non ci sono tracce di infiltrati linfocitari o macrofagici, a segnalare un processo infiammatorio non attivo, né di fibrosi.

A

NORM



IPO



B

	Disorganizzazione miofibrillare	Lisi Miofibrillare	Fibre Eosinofile	Fibre Ialine	Nuclei Interni	Cellule infiammatorie	Fibrosi
NORM	-	-	-	-	-/+	-	-
IPO	-	-	-	-	-	-	-

Figura 7: immagini rappresentative di sezioni longitudinali di muscolo scheletrico colorato con ematossilina ed eosina e osservato al microscopio ottico del gruppo di controllo normotermico NORM e del gruppo ipotermico IPO (Pannello A); risultati riepilogativi dell'analisi qualitativa cito-morfologica dei due gruppi sperimentali (Pannello B).

4.1.2. Microscopia elettronica

Anche per quanto concerne l'analisi istologica ultrastrutturale, il muscolo scheletrico dei ratti indotti in ipotermia si conferma morfologicamente paragonabile a quello dei ratti normotermici di controllo (Figura 8). L'organizzazione del sarcomero appare conservata e con una disposizione regolare di filamenti spessi (miosina) e sottili (actina), come evidenziato dall'assenza di differenze tra i campioni IPO (Figura 8, pannello D) e NORM (Figura 8, pannello C).

L'unica differenza riscontrata è la diminuzione del numero di mitocondri e di granuli di glicogeno nei campioni IPO rispetto a quelli NORM, apprezzabile sia nelle sezioni trasversali (Figura 8, pannelli A e B) che in quelle longitudinali (Figura 8, pannelli C e D). Lo specchietto in alto nella “Figura 8, pannello D” rappresenta l'incorporazione dei granuli di glicogeno nelle vescicole che risultano in questo modo non più disponibili.

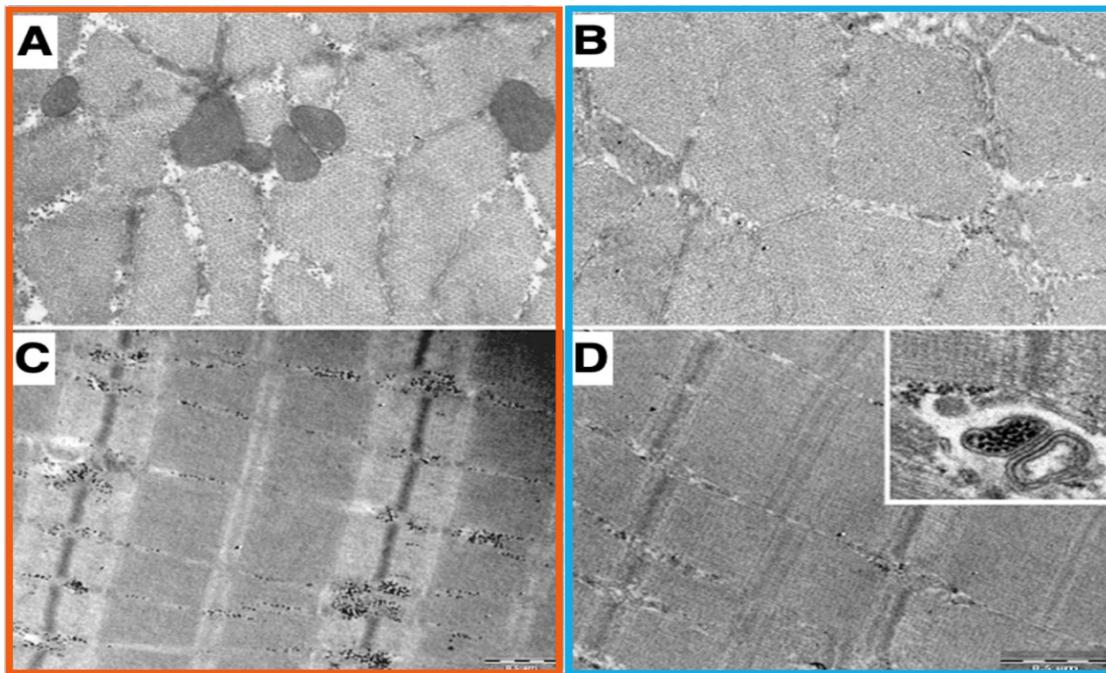


Figura 8: sezioni trasversali e longitudinali di tessuto muscolare scheletrico di campioni NORM (Pannelli A, C, in rosso) e IPO (Pannelli B, D, in blu) visti al microscopio elettronico a trasmissione.

4.2. ANALISI DELL'ESPRESSIONE GENICA

L'analisi differenziale del trascrittoma del gruppo IPO rispetto al gruppo NORM ha evidenziato la presenza di 1286 DEGs, di cui 572 sottoregolati e 714 sovraregolati. La visualizzazione di tale risultato è stata ottenuta tramite Volcano Plot (Figura 9), un diagramma a dispersione che mette in relazione la significatività statistica (espressa come $-\log_{10}$ di FDR, asse y) con il livello di espressione differenziale (espressa tramite \log_2 FC, asse x).

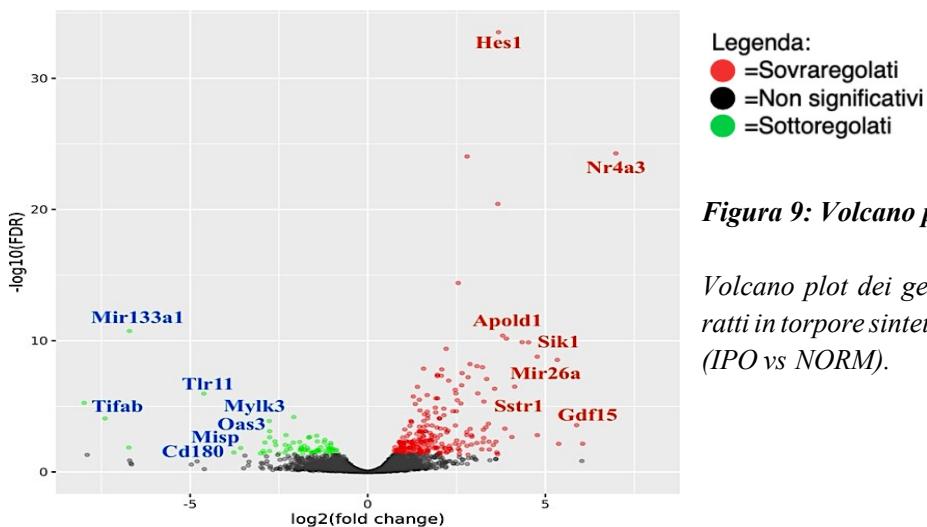


Figura 9: Volcano plot

Volcano plot dei geni differenzialmente espressi nei ratti in torpore sintetico rispetto a quelli normotermici (IPO vs NORM).

L'analisi bibliografica dei primi 30 geni sovraregolati, visibili in Tabella 1, ha evidenziato l'impatto del TS sul metabolismo lipidico, come suggerito dal forte aumento di espressione di **Nr4a3** (FC 6,44, il gene più sovraregolato), **Apold1** (FC 3,81) e **Sik1** (FC 4,17). Inoltre, è interessante notare come diversi tra i 30 geni più sovraregolati siano associati a fenomeni di rigenerazione muscolare e meccanismi anti-apoptotici, tra cui **Nr4a3**, **Gdf15** (FC 5,20) e **Mir26a** (FC 3,66).

8 tra i 30 geni più sottoregolati risultano associati alla risposta immunitaria (**Serpina1** (FC -5,64), **Tifab** (FC -4,72), **Cd180** (FC -4,17), **Oas3** (FC -3,90), **Evi2b** (FC -3,78), **Slc23a3** (FC -3,58), **Tlr1** (FC -3,32), **C3ar1** (FC -3,09)) mentre 3 geni sono legati a proliferazione cellulare (**C3ar1**, **Oas3** o **Misp** (FC -4,12)).

Sovraregolati		Sottoregolati	
Nome del gene	log2 Fold Change	Nome del gene	log2 Fold Change
Nr4a3	6,444842	Lrap	-7,36636254733
NA	5,749639	Mir133a1	-6,35183467107
Tchh	5,542201	Serpina1	-5,64094113263
NA	5,280915	Gsg1	-5,56721995991
Gdf15	5,200659	Oaz3	-5,35498629382
LOC108350152	4,717850	NA	-5,34710709846
LOC102549173	4,604206	LOC108352526	-5,23715172641
Styk1	4,588404	Tlr11	-4,93396875301
Gpr3	4,565278	LOC102552402	-4,78137874380
Hist1h2af	4,529272	Tifab	-4,72396271627
LOC103692107	4,524956	RGD1309362	-4,18625403165
Fut7	4,466308	Cd180	-4,16984149140
LOC680456	4,271206	Misp	-4,11840310005
Cyp2d2	4,253234	NA	-4,01546815361
Csrnp1	4,210591	Oas3	-3,90288299356
Sik1	4,169223	NA	-3,88964850445
Slc9a3	3,903216	MGC105567	-3,84141616944
Trnr	3,899495	LOC102556495	-3,80994253171
LOC102548706	3,856211	LOC102548409	-3,78691746154
Apold1	3,810424	Evi2b	-3,77995519584
NA	3,784466	Mylk3	-3,75448068009
Ptgs2	3,783465	NA	-3,71623331155
Alkal2	3,758602	Slc23a3	-3,57704030459
Sstr1	3,731440	Tlr1	-3,31538400556
Mir26a	3,656477	Gdf7	-3,29945833797
NA	3,642999	LOC108352757	-3,27979662515
Hes1	3,638209	Ephx3	-3,24667024746
Kcnk7	3,534541	NA	-3,12531765727
Kel	3,504481	C3ar1	-3,08857150466
Pnmt	3,380995	RGD1559575	-3,08849958390

Tabella 1: 30 geni maggiormente sovraregolati e sottoregolati nel gruppo IPO rispetto a NORM.

5. DISCUSSIONE

È ormai noto che gli animali ibernanti non manifestano atrofia muscolare al risveglio, dopo i periodi di prolungata inattività che caratterizzano il torpore, grazie a meccanismi in gran parte sconosciuti. C'è un crescente interesse nel comprendere se questa capacità possa essere replicata in animali non ibernanti, come i ratti e, eventualmente, nell'uomo. Per approfondire i cambiamenti che avvengono nel muscolo scheletrico durante l'ipotermia, questa tesi si è proposta di analizzare il profilo istopatologico del muscolo scheletrico del ratto dopo l'induzione di uno stato di profonda ipotermia (torpore sintetico, TS), esaminando le alterazioni morfologiche e ultrastrutturali del tessuto. Inoltre, è stata studiata l'espressione genica del muscolo scheletrico per identificare i geni più significativamente differenzialmente espressi rispetto ai ratti in condizioni normotermiche.

Come è possibile apprezzare dai risultati qui presentati, l'analisi morfologica del muscolo scheletrico del ratto indotto in TS (gruppo IPO) tramite colorazione con ematossilina-eosina non ha evidenziato differenze con il tessuto dell'animale di controllo (normotermico, gruppo NORM), suggerendo che, per quanto riguarda l'aspetto istologico, il tessuto risulta ben preservato. Questo risultato è incoraggiante, in quanto la condizione ipotermica non sembra indurre alcun processo patologico nel muscolo. Ciò è confermato anche nell'analisi ultrastrutturale tramite microscopio a trasmissione, dove non si evidenziano modifiche ultrastrutturali significative tra i due gruppi, ad eccezione della diminuzione del numero di mitocondri e di granuli di glicogeno nei campioni IPO rispetto a quelli NORM. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che gli animali del gruppo NORM continuano ad alimentarsi durante l'esperimento, mentre quelli del gruppo IPO sospendono l'alimentazione, portando alla necessità di mobilizzare le risorse tramite la gluconeogenesi e, quindi, a una diminuzione delle riserve di glicogeno muscolare.

L'analisi del trascrittoma del muscolo scheletrico ha rivelato un considerevole numero di geni con espressione significativamente differente tra le due condizioni sperimentali. Questo è un dato interessante, poiché ci si potrebbe aspettare che il meccanismo di trascrizione genica sia inattivo a temperature così basse. Tuttavia, abbiamo osservato un numero consistente di geni sovraregolati (714), suggerendo che la trascrizione genica sia in realtà attiva anche in condizioni di ipotermia profonda.

Il gene più sovraffatto nel muscolo scheletrico dei ratti in torpore sintetico rispetto a quelli normotermici è **Nr4a3** (FC 6,44), il recettore nucleare sottofamiglia 4, gruppo A, membro 3. Questo gene è coinvolto nel metabolismo degli acidi grassi e dei lipidi nel muscolo scheletrico, si trova sovraffatto negli animali con restrizioni alimentari ed è coinvolto nella rigenerazione degli organi e nella regolazione positiva dell'ipertrofia nel muscolo cardiaco (Oita et al., 2009).

Oltre a **Nr4a3**, tra i 30 geni più sovraregolati troviamo anche altri due geni legati al metabolismo lipidico: **Apold1** (FC 3,81), un membro della famiglia dell'apolipoproteine che svolge un ruolo critico nel metabolismo/trasporto lipidico e nelle funzioni vascolari (Regard et al., 2004); **Sik1** (FC 4,17) una serina/treonina chinasi coinvolta nella regolazione del ciclo cellulare, della gluconeogenesi e lipogenesi (S. Liu et al., 2020) e nella crescita e nella differenziazione muscolare.

È interessante notare come molti tra i 30 geni più sovraregolati siano associati a fenomeni di rigenerazione muscolare e meccanismi anti-apoptotici, come **Gdf15** e **Mir26a**. **Gdf15** (FC 5,20) è un fattore di differenziazione della crescita che si comporta come una proteina anti-apoptotica nelle cellule non cancerose e il cui aumento di produzione, in risposta a condizioni di stress, sembra permettere al muscolo di recuperare e riorganizzare la sua struttura, oltre che favorirne l'omeostasi (Assadi et al., 2020); **Mir26a** (FC 3,66) è un microRNA necessario per la differenziazione e rigenerazione del muscolo scheletrico. Esso inoltre ha un ruolo protettivo nel danno da ischemia-riperfusione in quanto è in grado di regolare geni coinvolti nella sopravvivenza cellulare, nell'apoptosi nello stress ossidativo e nell'infiammazione (Dey et al., 2012). Un altro

gene rilevante è **Hes1** (FC 3,64), un fattore di trascrizione coinvolto nella via di segnalazione Notch con effetto cardioprotettivo, coinvolto nella differenziazione, omeostasi tissutale e nella riduzione della produzione di specie reattive dell'ossigeno (Wang et al., 2022).

Tra i geni più sovrapregati degno di nota è **Sstr1** (FC 3,73), un recettore accoppiato a proteine G per la somatostatina, la cui attivazione negli ibernanti naturali è critica nella promozione l'ingresso in torpore (Scherbarth et al., 2015).

Tra i geni sottoregolati, molti sono associati alla risposta immunitaria. Esempi includono: **Tlr1** (FC -3,32), toll like receptor 1, che partecipa alla produzione di citochine (Duan et al., 2022); **Oas3** (FC -3,90) o 2'-5' oligoadenilato sintetasi 3, che svolge un ruolo nella risposta immunitaria alle infezioni virali e in altri processi cellulari come l'apoptosi, la crescita cellulare e la regolazione genica (Schwartz & Conn, 2019); **C3ar1** (FC -3,09), recettore 1 della componente 3a del complemento che ha un ruolo nella risposta immunitaria adattativa e produzione di citochine (Corcoran & Napier, 2022). Inoltre, a segnalare un trend trascrizionale di diminuzione della proliferazione cellulare c'è la sottoregolazione di geni come **C3ar1**, **Oas3** o **Misp** (FC -4,12). Quest'ultimo, ad esempio, è coinvolto nel posizionamento del fuso mitotico, nell'istituzione della localizzazione del centrosoma, nell'organizzazione del citoscheletro e nell'attività di legame ai filamenti di actina (Maier et al., 2013).

Mylk3 (FC -3,75), gene che codifica per una proteina coinvolta nella regolazione della contrazione muscolare, nella formazione della struttura muscolare, nel differenziamento e sviluppo di cellule muscolari striate oltre che nella segnalazione dello ione calcio (R. Liu et al., 2022).

In conclusione, l'analisi del trascrittoma ha rivelato una significativa sovrapregazione di numerosi geni coinvolti nel metabolismo lipidico, nella rigenerazione muscolare e nei meccanismi anti-apoptotici. Questi risultati indicano che la trascrizione genica rimane attiva anche a basse temperature, e che questa si orienta verso la preservazione del tessuto muscolare e il cambiamento del substrato metabolico verso l'ossidazione degli acidi grassi, similmente a quanto osservato negli animali ibernanti naturali (Hindle et al., 2011). Questi adattamenti potrebbero essere cruciali per la resistenza all'atrofia muscolare e per il mantenimento dell'omeostasi tissutale in condizioni di stress, offrendo spunti promettenti per applicazioni terapeutiche nell'uomo.

Risulta importante sottolineare che il protocollo di TS qui adottato ha una durata breve, plausibilmente non sufficiente ad instaurare una condizione di atrofia. In quest'ottica, il profilo trascrittomico del muscolo scheletrico suggerisce la possibilità che il trattamento prepari o predisponga il muscolo a resistere all'atrofia. I risultati di questo esperimento sottolineano quindi l'importanza di ulteriori indagini, che potrebbero esplorare gli effetti di un TS prolungato, superiore alle otto ore, e investigare più approfonditamente il ruolo dei geni differenzialmente espressi qui identificati. Ciò potrebbe ampliare la nostra comprensione dei processi cellulari coinvolti nel TS e identificare nuove potenziali implicazioni terapeutiche nella gestione dell'atrofia muscolare e dello stress metabolico.

6. BIBLIOGRAFIA

Andres-Mateos, E., Mejias, R., Soleimani, A., Lin, B. M., Burks, T. N., Marx, R., Lin, B., Zellars, R. C., Zhang, Y., Huso, D. L., Marr, T. G., Leinwand, L. A., Merriman, D. K., & Cohn, R. D. (2012). Impaired Skeletal Muscle Regeneration in the Absence of Fibrosis during Hibernation in 13-Lined Ground Squirrels. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048884>

Angus, D. C., & Van Der Poll, T. (2013). Sepsis NEJM 2013. *N Engl J Med*, 9369(29).

Arendt, T., Stieler, J., Strijkstra, A. M., Hut, R. A., Rüdiger, J., Van der Zee, E. A., Harkany, T., Holzer, M., & Härtig, W. (2003). Reversible paired helical filament-like phosphorylation of tau is an adaptive process associated with neuronal plasticity in hibernating animals. *Journal of Neuroscience*, 23(18). <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-18-06972.2003>

Assadi, A., Zahabi, A., & Hart, R. A. (2020). GDF15, an update of the physiological and pathological roles it plays: a review. In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 472, Issue 11). <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02459-1>

Batchelder, P., Kinney, R. O., Demlow, L., & Lynch, C. B. (1983). Effects of temperature and social interactions on huddling behavior in *Mus musculus*. *Physiology and Behavior*, 31(1). [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(83\)90102-6](https://doi.org/10.1016/0031-9384(83)90102-6)

Blackstone, E., Morrison, M., & Roth, M. B. (2005). H2S induces a suspended animation-like state in mice. *Science*, 308(5721). <https://doi.org/10.1126/science.1108581>

Bouma, H. R., Verhaag, E. M., Otis, J. P., Heldmaier, G., Swoap, S. J., Strijkstra, A. M., Henning, R. H., & Carey, H. V. (2012). Induction of torpor: Mimicking natural metabolic suppression for biomedical applications. In *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 227, Issue 4). <https://doi.org/10.1002/jcp.22850>

Carey, H. V., Frank, C. L., & Aw, T. Y. (2000). Cellular Response to Metabolic Stress in Hibernating Mammals. In *Life in the Cold*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04162-8_36

Carpenter, F. L., & Hixon, M. A. (1988). A New Function for Torpor: Fat Conservation in a Wild Migrant Hummingbird. *The Condor*, 90(2). <https://doi.org/10.2307/1368565>

Cerri, M., Zamboni, G., Tupone, D., Dentico, D., Luppi, M., Martelli, D., Perez, E., & Amici, R. (2010). Cutaneous vasodilation elicited by disinhibition of the caudal portion of the rostral ventromedial medulla of the free-behaving rat. *Neuroscience*, 165(3). <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2009.10.068>

Cerri, M., Mastrotto, M., Tupone, D., Martelli, D., Luppi, M., Perez, E., Zamboni, G., & Amici, R. (2013). The inhibition of neurons in the central nervous pathways for thermoregulatory cold defense induces a suspended animation state in the rat. *Journal of Neuroscience*, 33(7). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3596-12.2013>

Cerri, M., Tinganelli, W., Negrini, M., Helm, A., Scifoni, E., Tommasino, F., Sioli, M., Zoccoli, A., & Durante, M. (2016). Hibernation for space travel: Impact on radioprotection. In *Life Sciences in Space Research* (Vol. 11). <https://doi.org/10.1016/j.lssr.2016.09.001>

Cerri, M. (2017). The Central Control of Energy Expenditure: Exploiting Torpor for Medical Applications. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 79). <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034133>

Choukèr, A., Bereiter-Hahn, J., Singer, D., & Heldmaier, G. (2019). Hibernating astronauts—science or fiction? In *Pflugers Archiv European Journal of Physiology* (Vol. 471, Issue 6). <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2244-7>

Corcoran, J. A., & Napier, B. A. (2022). C3aR plays both sides in regulating resistance to bacterial infections. In *PLoS Pathogens* (Vol. 18, Issue 8). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010657>

Craig, A. D. (2002). How do you feel? Interception: The sense of the physiological condition of the body. *Nature Reviews Neuroscience*, 3(8). <https://doi.org/10.1038/nrn894>

Dey, B. K., Gagan, J., Yan, Z., & Dutta, A. (2012). miR-26a is required for skeletal muscle differentiation and regeneration in mice. *Genes and Development*, 26(19). <https://doi.org/10.1101/gad.198085.112>

Drew, K. L., Buck, C. L., Barnes, B. M., Christian, S. L., Rasley, B. T., & Harris, M. B. (2007). Central nervous system regulation of mammalian hibernation: Implications for metabolic suppression and ischemia tolerance. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 102, Issue 6). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04675.x>

Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y., & Wang, R. F. (2022). Toll-Like Receptor Signaling and Its Role in Cell-Mediated Immunity. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 13). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.812774>

French, A. R. (1985). Allometries of the durations of torpid and euthermic intervals during mammalian hibernation: A test of the theory of metabolic control of the timing of changes in body temperature. *Journal of Comparative Physiology B*, 156(1). <https://doi.org/10.1007/BF00692921>

Geiser, F. (2004). Metabolic rate and body temperature reduction during hibernation and daily torpor. In *Annual Review of Physiology* (Vol. 66). <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.66.032102.115105>

Geiser, F., & Brigham, R. M. (2012). The Other Functions of Torpor. In *Living in a Seasonal World*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-28678-0_10

Harlow, H. J., Lohuis, T., Beck, T. D. I., & Iaizzo, P. A. (2001). Muscle strength in overwintering bears. *Nature*, 409(6823). <https://doi.org/10.1038/35059165>

Heldmaier, G., Ortmann, S., & Elvert, R. (2004). Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals. *Respiratory Physiology and Neurobiology*, 141(3). <https://doi.org/10.1016/j.resp.2004.03.014>

Hindle, A. G., Karimpour-Fard, A., Epperson, L. E., Hunter, L. E., & Martin, S. L. (2011). Skeletal muscle proteomics: Carbohydrate metabolism oscillates with seasonal and torpor-arousal physiology of hibernation. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 301(5). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00298.2011>

Hrvatin, S., Sun, S., Wilcox, O. F., Yao, H., Lavin-Peter, A. J., Cicconet, M., Assad, E. G., Palmer, M. E., Aronson, S., Banks, A. S., Griffith, E. C., & Greenberg, M. E. (2020). Neurons that regulate mouse torpor. *Nature*, 583(7814). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2387-5>

Hudson, J. W., & Scott, I. M. (1979). Daily Torpor in the Laboratory Mouse, *Mus musculus* Var. Albino. *Physiological Zoology*, 52(2). <https://doi.org/10.1086/physzool.52.2.30152564>

Ivanov, K. P. (2006). The development of the concepts of homeothermy and thermoregulation. *Journal of Thermal Biology*, 31(1-2 SPEC. ISS.). <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2005.12.005>

Jani, A., Martin, S. L., Jain, S., Keys, D., & Edelstein, C. L. (2013). Renal adaptation during hibernation. In *American Journal of Physiology - Renal Physiology* (Vol. 305, Issue 11). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00675.2012>

Kearney, M., Shine, R., & Porter, W. P. (2009). The potential for behavioral thermoregulation to buffer “cold-blooded” animals against climate warming. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.0808913106>

Liu, N., Bezprozvannaya, S., Shelton, J. M., Frisard, M. I., Hulver, M. W., McMillan, R. P., Wu, Y., Voelker, K. A., Grange, R. W., Richardson, J. A., Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2011). Mice lacking microRNA 133a develop dynamin 2-dependent centronuclear myopathy. *Journal of Clinical Investigation*, 121(8). <https://doi.org/10.1172/JCI46267>

Liu, R., Han, M., Liu, X., Yu, K., Bai, X., & Dong, Y. (2022). Genome-Wide Identification and Characterization of Long Non-Coding RNAs in Longissimus dorsi Skeletal Muscle of Shandong Black Cattle and Luxi Cattle. *Frontiers in Genetics*, 13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.849399>

Liu, S., Huang, S., Wu, X., Feng, Y., Shen, Y., Zhao, Q. shi, & Leng, Y. (2020). Activation of SIK1 by phanginin A inhibits hepatic gluconeogenesis by increasing PDE4 activity and suppressing the cAMP signaling pathway. *Molecular Metabolism*, 41. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2020.101045>

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

Maier, B., Kirsch, M., Anderhub, S., Zentgraf, H., & Krämer, A. (2013). The novel actin/focal adhesion-associated protein MISP is involved in mitotic spindle positioning in human cells. *Cell Cycle*, 12(9). <https://doi.org/10.4161/cc.24602>

McKechnie, A. E., & Lovegrove, B. G. (2002). Avian facultative hypothermic responses: A review. In *Condor* (Vol. 104, Issue 4). [https://doi.org/10.1650/0010-5422\(2002\)104\[0705:AFHRAR\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1650/0010-5422(2002)104[0705:AFHRAR]2.0.CO;2)

Milsom, W. K., Zimmer, M. B., & Harris, M. B. (1999). Regulation of cardiac rhythm in hibernating mammals. In *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology* (Vol. 124, Issue 4). [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(99\)00130-0](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(99)00130-0)

Morrison, S. F. (2016). Central neural control of thermoregulation and brown adipose tissue. In *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* (Vol. 196). <https://doi.org/10.1016/j.autneu.2016.02.010>

Morrison, S. F. (2018). Efferent neural pathways for the control of brown adipose tissue thermogenesis and shivering. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 156). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00017-5>

Moy, R. M. (1971). Renal function in the hibernating ground squirrel *Spermophilus columbianus*. *The American Journal of Physiology*, 220(3). <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1971.220.3.747>

Musacchia, X. J., & Barr, R. E. (1968). Survival of whole-body-irradiated hibernating and active ground squirrels; *Citellus tridecemlineatus*. *Radiation Research*, 33(2). <https://doi.org/10.2307/3572485>

Nakamura, K., & Morrison, S. F. (2010). A thermosensory pathway mediating heat-defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(19). <https://doi.org/10.1073/pnas.0913358107>

Nakayama, T., Hammel, H. T., Hardy, J. D., & Eisenman, J. S. (1963). Thermal stimulation of electrical activity of single units of the preoptic region. *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 204(6). <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1963.204.6.1122>

Oita, R. C., Mazzatti, D. J., Lim, F. L., Powell, J. R., & Merry, B. J. (2009). Whole-genome microarray analysis identifies up-regulation of Nr4a nuclear receptors in muscle and liver from diet-restricted rats. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(4). <https://doi.org/10.1016/j.mad.2008.12.004>

Paton, J. F. R., Boscan, P., Pickering, A. E., & Nalivaiko, E. (2005). The yin and yang of cardiac autonomic control: Vago-sympathetic interactions revisited. In *Brain Research Reviews* (Vol. 49, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2005.02.005>

Paxinos, G., & Charles Watson. (2007). The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition. In *Elsevier Academic Press* (Vol. 170).

Pengelley, E. T., & Fisher, K. C. (1961). RHYTHMICAL AROUSAL FROM HIBERNATION IN THE GOLDEN-MANTLED GROUND SQUIRREL, *CITELLUS LATERALIS TESCORUM*. *Canadian Journal of Zoology*, 39(1). <https://doi.org/10.1139/z61-013>

Regard, J. B., Scheek, S., Borbiev, T., Lanahan, A. A., Schneider, A., Demetriades, A. M., Hiemisch, H., Barnes, C. A., Verin, A. D., & Worley, P. F. (2004). Verge: A Novel Vascular Early Response Gene. *Journal of Neuroscience*, 24(16). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4252-03.2004>

Reilly, B. D., & Franklin, C. E. (2016). Prevention of muscle wasting and osteoporosis: The value of examining novel animal models. In *Journal of Experimental Biology* (Vol. 219, Issue 17). <https://doi.org/10.1242/jeb.128348>

Romanovsky, A. A. (2018). The thermoregulation system and how it works. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 156). <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00001-1>

Ruby, N. F. (2003). Hibernation: When good clocks go cold. In *Journal of Biological Rhythms* (Vol. 18, Issue 4). <https://doi.org/10.1177/0748730403254971>

Ruf, T., Stieglitz, A., Steinlechner, S., Blank, J. L., & Heldmaier, G. (1993). Cold exposure and food restriction facilitate physiological responses to short photoperiod in Djungarian hamsters (*Phodopus sungorus*). *Journal of Experimental Zoology*, 267(2). <https://doi.org/10.1002/jez.1402670203>

Ruf, T., & Geiser, F. (2015). Daily torpor and hibernation in birds and mammals. *Biological Reviews*, 90(3). <https://doi.org/10.1111/brv.12137>

Scherbarth, F., Diedrich, V., Dumbell, R. A., Schmid, H. A., Steinlechner, S., & Barrett, P. (2015). Somatostatin receptor activation is involved in the control of daily torpor in a seasonal mammal. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 309(6). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00191.2015>

Schwartz, S. L., & Conn, G. L. (2019). RNA regulation of the antiviral protein 2'-5'-oligoadenylate synthetase. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 10, Issue 4). <https://doi.org/10.1002/wrna.1534>

Secor, S. M., & Lignot, J. H. (2010). Morphological plasticity of vertebrate aestivation. In *Progress in molecular and subcellular biology* (Vol. 49). https://doi.org/10.1007/978-3-642-02421-4_9

Staples, J. F. (2016). Metabolic flexibility: Hibernation, torpor, and estivation. *Comprehensive Physiology*, 6(2). <https://doi.org/10.1002/cphy.c140064>

Storey, K. B., & Storey, J. M. (1990). Metabolic rate depression and biochemical adaptation in anaerobiosis, hibernation and estivation. *Quarterly Review of Biology*, 65(2). <https://doi.org/10.1086/416717>

Swoap, S. J., & Gutilla, M. J. (2009). Cardiovascular changes during daily torpor in the laboratory mouse. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 297(3). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00131.2009>

Takahashi, T. M., Sunagawa, G. A., Soya, S., Abe, M., Sakurai, K., Ishikawa, K., Yanagisawa, M., Hama, H., Hasegawa, E., Miyawaki, A., Sakimura, K., Takahashi, M., & Sakurai, T. (2020). A discrete neuronal circuit induces a hibernation-like state in rodents. *Nature*, 583(7814). <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2163-6>

Terrien, J., Perret, M., & Aujard, F. (2011). Behavioral thermoregulation in mammals: A review. *Frontiers in Bioscience*, 16(4). <https://doi.org/10.2741/3797>

Tupone, D., Madden, C. J., & Morrison, S. F. (2013). Central activation of the A1 adenosine receptor (A1AR) induces a hypothermic, torpor-like state in the rat. *Journal of Neuroscience*, 33(36). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1980-13.2013>

Von Der Ohe, C. G., Darian-Smith, C., Garner, C. C., & Heller, H. C. (2006). Ubiquitous and temperature-dependent neural plasticity in hibernators. *Journal of Neuroscience*, 26(41). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2874-06.2006>

Von Der Ohe, C. G., Garner, C. C., Darian-Smith, C., & Heller, H. C. (2007). Synaptic protein dynamics in hibernation. *Journal of Neuroscience*, 27(1). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4385-06.2007>

Wang, L., Lai, S., Zou, H., Zhou, X., Wan, Q., Luo, Y., Wu, Q., Wan, L., Liu, J., & Huang, H. (2022). Ischemic preconditioning/ischemic postconditioning alleviates anoxia/reoxygenation injury via the Notch1/Hes1/VDAC1 axis. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 36(11). <https://doi.org/10.1002/jbt.23199>

Wetsel, W. C. (2011). Sensing hot and cold with TRP channels. *International Journal of Hyperthermia*, 27(4). <https://doi.org/10.3109/02656736.2011.554337>

Wilz, M., & Heldmaier, G. (2000). Comparison of hibernation, estivation and daily torpor in the edible dormouse, *Glis glis*. *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 170(7). <https://doi.org/10.1007/s003600000129>